

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Einfluss der Bestrahlung ( $\lambda = 453 \text{ nm}$ ) auf modulierende Proteine der reaktiven  
Sauerstoffspezies (ROS) in der Pathogenese des Morbus Dupuytren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marie Heike Wohltmann

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Simon Thelen

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Timm J. Filler

„Fragen war die Hauptsache.“

- Franz Kafka, der Prozess, 7. Kapitel

Für Loki

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Als Präsentation auf dem Deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 25.10.2019

Illuminating the effect of beneficial blue light and ROS-modulating enzymes in Dupuytren's disease;  
Jaekel C, Thelen S, Oezel L, Wohltmann MH, Wille J, et al. (2021) Illuminating the effect of  
beneficial blue light and ROS-modulating enzymes in Dupuytren's disease. PLOS ONE 16(7):  
e0253777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253777>

## Zusammenfassung

Morbus Dupuytren (MD) ist eine fibroproliferative Erkrankung der Palmarfaszie genetischer, immunologischer und ischämischer Genese. Klinisch kommt es zu einer zunehmenden fixierten Beugekontraktur der betroffenen Finger und deren Funktionseinschränkung. Zudem findet sich eine hohe Rezidivrate. Kennzeichen der Erkrankung sind erhöhte Level reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und eine vermehrte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, unter anderem induziert durch Wachstumsfaktoren wie *Transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ). Es konnte bereits von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Expression des  *$\alpha$ -smooth muscle actin* ( $\alpha$ -sma), ein Surrogatparameter für vermehrte Myofibroblastengnese, durch Bestrahlung mit blauem Licht  $\lambda = 453$  nm signifikant inhibiert wird. Dies könnte mit durch Bestrahlung induzierten ROS in Zusammenhang stehen. Bis dato konnte nicht abschließend geklärt werden, welche Mechanismen der ROS-Induktion sowie den erhöhten ROS-Leveln zugrunde liegen und welche Bedeutung sie für den Effekt der Bestrahlung haben. Ziel dieser Arbeit ist es aufzuklären, ob der therapeutische Effekt des blauen Lichtes über die ROS-Generierung vermittelt werden könnte, welche ROS-modulierenden Enzyme an der Erhöhung der ROS in MD-Fibroblasten beteiligt sein könnten und ob die Reduktion der  $\alpha$ -sma-Expression auch pharmakologisch induziert werden könnte. Mit oder ohne TGF $\beta$ 1 (1ng/ml) behandelte MD- und Karpaltunnelsyndrom (CTS)-Fibroblasten wurden 3 bzw. 5 Tage mit blauem Licht ( $\lambda = 453$  nm, 40 J/cm<sup>2</sup> und 38 mW/cm<sup>2</sup>) bestrahlt. Weitere MD- und CTS-Zellen wurden 5 Tage mit TGF $\beta$ 1 (0/1/5/10 ng/ml) behandelt und mit einer gleichbehandelten Gruppe unter Zugabe eines TGF-Rezeptor-Inhibitors (SB-431542) (0,5  $\mu$ Mol) verglichen. Eine weitere Gruppe von MD/CTS-Fibroblasten wurde mit TGF $\beta$  und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. Die Auswertung erfolgte mittels Glutathionsperoxidase-Assay, durchflusszytometrischer und Western-Blot-Analyse. Die Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ebenso wie blaues Licht, zu einer Inhibition der  $\alpha$ -sma-Expression führt. In MD- ist im Vergleich mit gleichbehandelten CTS-Fibroblasten die Expression der Mangan-Superoxiddismutase (Mn-SOD) signifikant, auf ca. die Hälfte, erniedrigt. Weiterhin konnte bei mit TGF $\beta$  behandelten CTS- und MD-Fibroblasten eine durch Bestrahlung um bis zu 2/3 verminderte Katalase-Expression nachgewiesen werden. Es konnte eine erhöhte Expression von TGF $\beta$  hLAP in MD nachgewiesen werden. Weiterhin konnte evaluiert werden, dass die  $\alpha$ -sma-Expression durch Zugabe von SB-431542 (ein TGF $\beta$ -Inhibitor) ebenfalls erniedrigt werden kann, während die Mn-SOD verstärkt exprimiert wird.

Die erniedrigte Expression der Mn-SOD konnte als mögliche Quelle erhöhter ROS in MD ausfindig gemacht werden. Die Ergebnisse des TGF $\beta$ -Inhibitions- und Bestrahlungsversuches deuten an, dass die Mn-SOD-Expression durch TGF $\beta$  inhibiert wird. Die Bestrahlung könnte die ROS-Level durch eine Inhibition der Katalase weiter erhöhen. Unterstützt wird dieses Ergebnis und eine mögliche Verbindung von ROS und Bestrahlungseffekten durch die Inhibition der  $\alpha$ -sma-Expression durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Darüber hinaus werden alternative Behandlungsmöglichkeiten durch die pharmakologische Inhibition der  $\alpha$ -sma-Expression aufgezeigt.

## Summary

Dupuytren's contracture (Morbus Dupuytren, MD) is a fibroproliferative disease of the palmar fascia caused by genetic, ischemic and immunologic alterations. Patients undergo an increasing contracture of the afflicted fingers, resulting in loss of function. Furthermore, it is hallmarked by an inclination towards relapse. MD is characterized by elevated levels of reactive oxygen species (ROS) and an increased differentiation of fibroblasts to myofibroblasts, inducible by growth factors like transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ). It is already known that radiation with blue light  $\lambda = 453$  nm inhibits expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -sma), a known surrogate parameter of myofibroblasts. This might be due to a further blue light induced elevation of ROS. The source of the increased ROS in MD, Involvement of ROS-modulating enzymes in radiation induced oxidative stress and ROS' meaning for the radiation's effects aren't fully understood yet. Major subjects of the present study are whether the therapeutic effect of blue light may depend on ROS, the investigation of possible sources for the ROS and to provide further insight into the possibility of a pharmacological inhibition of  $\alpha$ -sma-expression.

MD- and carpal tunnel syndrome (CTS)-fibroblasts (+/- TGF $\beta$ 1 (1ng/ml)) were radiated with 40 J/cm<sup>2</sup>, 38 mW/cm<sup>2</sup> and a wavelength of  $\lambda = 453$  nm for three and five days, respectively. Another group of MD- and CTS-fibroblasts were incubated with 0/1/5/10 ng/ml TGF $\beta$ 1 and 0,5  $\mu$ Mol of a TGF $\beta$ -Receptor-Inhibitor (SB-431542) for 5 days and compared with a control receiving the same TGF $\beta$ -treatment. Further MD- and CTS-fibroblasts were incubated with TGF $\beta$  and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Analyses were carried out with Western Blot, FACS and Glutathione Peroxidase-Assay. Treatment of MD-cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decreases expression of  $\alpha$ -sma, pointing towards a possible connection between ROS, radiation and inhibition of  $\alpha$ -sma-expression. Additionally, MD-fibroblasts exposed to blue light and TGF $\beta$  demonstrated a decreased expression of Mn-SOD compared to CTS-fibroblasts, expressing on average half the amount of Mn-SOD. Moreover, in both test groups fibroblasts treated with blue light + TGF $\beta$  reduced Catalase-expression by maximal 2/3. There was an increased expression of TGF $\beta$  hLAP in MD. Furthermore,  $\alpha$ -sma-expression decreased in presence of SB-431542 (a TGF $\beta$ -inhibitor), whereas expression of Mn-SOD seemed to be induced by SB.

In conclusion, lowered basic expression of Mn-SOD may be one factor contributing to elevated ROS-levels in MD. The results of the TGF $\beta$ -inhibition and radiation suggest that TGF $\beta$  may inhibit expression of Mn-SOD. Further increase of ROS-levels in radiated cells may be caused by lowered Catalase-expression. The inhibition of  $\alpha$ -sma-expression by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> supports these findings as well as a possible connection between ROS and blue light effects. The findings concerning a pharmacological inhibition of  $\alpha$ -sma expression point on the potential to improve the radiation's effect or add an alternative treatment.

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
-	Kontrolle
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µmol	Mikromolar
µl	Mikroliter
α-sma	α-smooth muscle actin
Abb.	Abbildung
ALK	activin receptor-like kinase
BCA	Bicinchoninsäure
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
Ca	Calcium
CTS	Karpaltunnelsyndrom
Cu	Kupfer
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium mit 4,5g Glucose pro Liter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
EDA-Fn	Extra domain A Fibronektin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence-activated cell scanning
FBS	Fetal bovine serum
G	Maßeinheit für RCF ( <i>relative centrifuge force</i> ), $RCF = 1.118 * 10^{-5} * r * (rpm)^2$
GPX	Glutathionperoxidase
H	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-ethansulfonsäure
hLAP	humanes latency associated peptide
J	Joule
K	Kontrolle
LAP	<i>latency-associated protein</i>
LTBP-1	<i>latent TGFβ1-binding protein</i>
max.	Maximal
MD	Morbus Dupuytren
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
min	Minuten
mind.	Mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
Mn-SOD	Mangan Superoxiddismutase (auch: SOD2)
mW	Milliwatt
NAC	N-Acetyl-Cystein
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nm	Nanometer
NOX4	NADPH-Oxidase 4

Abkürzungsverzeichnis	
PBS	Phosphate buffered saline
pH	potentia Hydrogenii
RIPA (-buffer)	Radioimmunoprecipitation assay (buffer)
RT	Raumtemperatur
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	revolutions per minute; „Umdrehungen pro Minute“
s.	Siehe
SB	SB-431542
SBV	SB-Versuch (TGF $\beta$ -Inhibitions-Versuch)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sek	Sekunden
SMAD	<i>Small Body Size</i> = SMA (Gen aus <i>Caenorhabditis elegans</i> ), <i>Mothers Against Decapentaplegic</i> = MAD (Gen aus <i>Drosophila</i> )
SOD1	Kupfer-Zink Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween 20
TGF $\beta$ 1/2/3	Transforming growth factor $\beta$ 1/2/3
TGF $\beta$ -R I	TGF-Rezeptor I
TGF $\beta$ -R II	TGF-Rezeptor II
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
Tris	Tris(hydroxymethyl)methylamin
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
UV	Ultraviolett
vs	Versus
W	Watt

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Ätiologie und Verlauf des Morbus Dupuytren.....	1
1.2	Fibroblasten und Myofibroblasten und ihre Bedeutung im Morbus Dupuytren.....	3
1.3	Die Rolle des TGF $\beta$ in der Myofibroblastengnese.....	4
1.4	Der Einfluss der ROS auf die Pathogenese des MD .....	6
1.4.1	Rolle der ROS-modulierende Enzyme und Transkriptionsfaktoren .....	7
1.5	Therapieoptionen des Morbus Dupuytren.....	10
1.6	Blaues Licht als Therapieoption des Morbus Dupuytren.....	11
1.7	Ziele der Arbeit .....	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>14</b>
2.1	Patienten und Probenmaterial.....	14
2.2	Materialien .....	14
2.3	Zellkultur.....	22
2.3.1	Einfrieren und Auftauen der Fibroblasten.....	22
2.3.2	Aussaat der Fibroblasten .....	23
2.4	Inkubation der Fibroblasten mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	24
2.5	Bestrahlung der Fibroblasten mit blauem Licht ( $\lambda = 453 \text{ nm}$ ).....	24
2.6	GPX-Assay.....	25
2.7	Durchflusszytometrische Bestimmung der Proteinexpression.....	25
2.8	Die Behandlung der Fibroblasten mit dem Inhibitor SB-431542 .....	26
2.9	Proteinernte für die Western Blot-Analyse .....	27
2.10	Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot-Analyse.....	27
2.10.1	BCA-Proteinassay .....	27
2.10.2	Western Blot-Analyse .....	27
2.11	Statistische Auswertung.....	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>

3.1	Der Effekt von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf die $\alpha$ -sma-Expression.....	31
3.2	Evaluation der Proteinexpression von ROS-modulierenden Enzymen und Transkriptionsfaktoren .....	33
3.2.1	Beeinflussung der $\alpha$ -sma-Expression durch Bestrahlung mit blauem Licht .....	34
3.2.2	Beeinflussung der $\beta$ -Catenin-Expression durch Bestrahlung mit blauem Licht ..	37
3.2.3	Beeinflussung der NF $\kappa$ B-Expression durch Bestrahlung mit blauem Licht .....	40
3.2.4	Beeinflussung der Katalase-Expression durch Bestrahlung mit blauem Licht ....	41
3.2.5	Beeinflussung der NOX4-Expression durch Bestrahlung mit blauem Licht .....	44
3.2.6	Beeinflussung der SOD1-Expression durch Bestrahlung mit blauem Licht.....	46
3.2.7	Beeinflussung der Mn-SOD-Expression durch Bestrahlung mit blauem Licht ...	47
3.3	Untersuchung der Aktivität der GPX.....	51
3.4	Durchflusszytometrische Analyse der TGF-Rezeptoren und TGF $\beta$ hLAP.....	52
3.5	Behandlung der Fibroblasten mit SB-431542 .....	52
3.5.1	Beeinflussung der $\alpha$ -sma-Expression durch SB-Behandlung .....	52
3.5.2	Beeinflussung der Mn-SOD-Expression durch SB-Behandlung .....	55
3.5.3	Beeinflussung der NOX4- und Katalase-Expression durch SB-Behandlung.....	57
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>58</b>
4.1	Modulation der $\alpha$ -sma- und TGF $\beta$ hLAP-Expression in CTS und MD.....	58
4.2	Die Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren durch Bestrahlung .....	60
4.3	Die Beeinflussung der Expression der ROS-modulierenden Enzyme durch Bestrahlung und SB-431542 .....	61
4.4	Limitationen.....	65
4.5	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	66
<b>5</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>78</b>
6.1	Anhang I: Methodische Vorversuche zur Ladekontrolle .....	78
6.2	Anhang II: Spenderliste.....	79
6.3	Anhang III: Ergebnisse – Daten und grafische Darstellung.....	83
6.3.1	IIIa: Beeinflussung der $\alpha$ -sma-Expression durch Bestrahlung.....	83

6.3.2	IIIb: Beeinflussung der $\beta$ -Catenin-Expression durch Bestrahlung.....	85
6.3.3	IIIc: Beeinflussung der NF $\kappa$ B-Expression durch Bestrahlung.....	87
6.3.4	IIId: Beeinflussung der Katalase-Expression durch Bestrahlung.....	89
6.3.5	IIIe: Beeinflussung der NOX4-Expression durch Bestrahlung.....	92
6.3.6	IIIf: Beeinflussung der SOD1-Expression durch Bestrahlung.....	94
6.3.7	IIIg: Beeinflussung der Mn-SOD-Expression durch Bestrahlung.....	98
6.3.8	IIIh: Durchflusszytometrische Analyse.....	99
6.3.9	IIIi: Behandlung mit SB 431542.....	102
6.3.10	IIIj: Beeinflussung der GPX-Aktivität durch Bestrahlung.....	106
6.3.11	IIIk: Beeinflussung der $\alpha$ -sma-Expression durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Behandlung.....	110
6.4	Anhang IV: Rohwerte.....	111

## Abbildungsverzeichnis

Nummer	Name	Seite
<b>Abb. 1</b>	Schema der Versuchsdurchführung	23
<b>Abb. 2</b>	Schematische Darstellung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Behandlung	24
<b>Abb. 3</b>	Exemplarische Darstellung der Bestrahlungsexperimente	24
<b>Abb. 4</b>	Grafische Darstellung der Behandlung mit SB-431542	26
<b>Abb. 5</b>	$\alpha$ -sma-Expression in MD, Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + TGF $\beta$ 1 ng/ml, (n = 3)	31
<b>Abb. 6</b>	$\alpha$ -sma-Expression in MD, Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + TGF $\beta$ 5 ng/ml, (n = 3)	32
<b>Abb. 7</b>	$\alpha$ -sma-Expression in MD, Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + TGF $\beta$ 10 ng/ml, (n = 3)	32
<b>Abb. 8</b>	$\alpha$ -sma-Expression in MD, Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und TGF $\beta$ 10 ng/ml, normiert auf TGF $\beta$ -Gruppe, (n = 3)	33
<b>Abb. 9</b>	$\alpha$ -sma 3 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot	34
<b>Abb. 10</b>	$\alpha$ -sma 3 Tage MD, (n = 8)	34
<b>Abb. 11</b>	$\alpha$ -sma 3 Tage CTS, (n = 8)	35
<b>Abb. 12</b>	$\alpha$ -sma 5 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot	35
<b>Abb. 13</b>	$\alpha$ -sma 5 Tage MD, (n = 8)	36
<b>Abb. 14</b>	$\alpha$ -sma 5 Tage CTS, (n = 8)	36
<b>Abb. 15</b>	$\beta$ -Catenin 5 Tage CTS vs MD, (n = 8)	37
<b>Abb. 16</b>	$\beta$ -Catenin 3 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot	37
<b>Abb. 17</b>	$\beta$ -Catenin 3 Tage CTS, (n = 8)	38
<b>Abb. 18</b>	$\beta$ -Catenin 5 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot	38
<b>Abb. 19</b>	$\beta$ -Catenin 5 Tage MD, (n = 8)	39
<b>Abb. 20</b>	$\beta$ -Catenin 5 Tage CTS, (n = 8)	39
<b>Abb. 21</b>	NF $\kappa$ B 3 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot	40
<b>Abb. 22</b>	NF $\kappa$ B 3 Tage CTS, (n = 8)	40
<b>Abb. 23</b>	NF $\kappa$ B 5 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot	41
<b>Abb. 24</b>	NF $\kappa$ B 5 Tage MD, (n = 8)	41
<b>Abb. 25</b>	Katalase 3 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot	42
<b>Abb. 26</b>	Katalase 3 Tage MD, (n = 8)	42
<b>Abb. 27</b>	Katalase 3 Tage CTS, (n = 8)	43
<b>Abb. 28</b>	Katalase 5 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot	43
<b>Abb. 29</b>	Katalase 5 Tage MD, (n = 8)	44
<b>Abb. 30</b>	NOX4 3 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot	44
<b>Abb. 31</b>	NOX4 3 Tage MD, (n = 8)	45
<b>Abb. 32</b>	NOX4 3 Tage CTS, (n = 8)	45
<b>Abb. 33</b>	NOX4 5 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot	46
<b>Abb. 34</b>	SOD1 3 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot	46
<b>Abb. 35</b>	SOD1 3 Tage CTS, (n = 8)	47
<b>Abb. 36</b>	SOD1 5 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot	47
<b>Abb. 37</b>	Mn-SOD 3 Tage CTS vs MD, (n = 8)	48
<b>Abb. 38</b>	Mn-SOD 5 Tage CTS vs MD, (n = 8)	48
<b>Abb. 39</b>	Mn-SOD 3 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot	49
<b>Abb. 40</b>	Mn-SOD 3 Tage CTS, (n = 8)	49
<b>Abb. 41</b>	Mn-SOD 5 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot	50
<b>Abb. 42</b>	Mn-SOD 5 Tage MD, (n = 8)	50
<b>Abb. 43</b>	Mn-SOD 5 Tage CTS, (n = 8)	51
<b>Abb. 44</b>	GPX 5 Tage CTS, (n = 9)	51
<b>Abb. 45</b>	FACS TGF $\beta$ hLAP CTS vs MD, (n = 8)	52
<b>Abb. 46</b>	$\alpha$ -sma MD, K vs SB, (n = 5)	53
<b>Abb. 47</b>	$\alpha$ -sma MD, K vs SB, exemplarischer Western Blot	53
<b>Abb. 48</b>	$\alpha$ -sma MD, K vs SB, normiert auf jeweiliges TGF, (n = 5)	54
<b>Abb. 49</b>	$\alpha$ -sma CTS, K vs SB, (n = 5)	54
<b>Abb. 50</b>	$\alpha$ -sma CTS, K vs SB, exemplarischer Western Blot	55

Nummer	Name	Seite
<b>Abb. 51</b>	$\alpha$ -sma CTS, K vs SB, normiert auf jeweiliges TGF, (n = 5)	55
<b>Abb. 52</b>	Mn-SOD MD, K vs SB, (n = 5)	56
<b>Abb. 53</b>	Mn-SOD MD, K vs SB, exemplarischer Western Blot	56
<b>Abb. 54</b>	Mn-SOD CTS, K vs SB, (n = 5)	57
<b>Abb. 55</b>	Mn-SOD CTS, K vs SB, exemplarischer Western Blot	57
<b>Abb. 56</b>	Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen MD und CTS	63
<b>Abb. 57</b>	Schematische Darstellung der Behandlungseffekte in MD-Fibroblasten	65

## Tabellenverzeichnis

Nummer	Name	Seite
<b>Tab. 1</b>	Tubiana-Klassifikation	1
<b>Tab. 2</b>	Materialien	14
<b>Tab. 3</b>	Software	18
<b>Tab. 4</b>	Substanzen	18
<b>Tab. 5</b>	Puffer	21
<b>Tab. 6</b>	FACS Antikörper	26
<b>Tab. 7</b>	BSA-Standard	27
<b>Tab. 8</b>	Western Blot Antikörper	29
<b>Tab. 9</b>	Sekundärantikörper und Leiter	30

# 1 Einleitung

## 1.1 Ätiologie und Verlauf des Morbus Dupuytren

Morbus Dupuytren (MD) ist eine superfizielle Fibromatose der Palmaraponeurose, bei der es durch Verkürzungen der Aponeurose zu Kontrakturen der Hohlhand kommt. Die Erkrankung betrifft vor allem die Gruppe älterer, männlicher und weißer Personen (Hueston, 1962) und ist assoziiert mit Alkoholkonsum (Attali et al., 1987), Diabetes (Larkin und Frier, 1986) sowie HIV (Bower et al., 1990). Das Verhältnis männlicher zu weiblichen Erkrankten beträgt 7:1, mit höherer Prävalenz in Nordeuropa (Brenner et al., 2001, Hindocha, 2018). Die Prävalenz ist in der Altersgruppe der 55-jährigen 12 %, in der der 75-jährigen 29 %, und nimmt also mit steigendem Alter zu (Lanting et al., 2014). Eine genetische Disposition gilt als erwiesen (Hu et al., 2005, Grazina et al., 2019), ebenso spielen mitochondriale Mutationen (Bayat et al., 2005) eine Rolle. Insgesamt handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung, deren Ätiologie nicht abschließend geklärt ist.

Die Erkrankungsmanifestation beginnt palmar, zumeist im Bereich der Hohlhand, und betrifft größtenteils den 4. und 5. Finger (Grazina et al., 2019, Shaw et al., 2007). Die Krankheit kann in die Stadien 0 – IV eingeteilt werden, wobei in Stadium 0 lediglich Knoten oder Stränge ohne Kontraktur, im Stadium I eine Kontraktur von 0-45°, II 45-90°, III 90-135° und in Stadium IV eine Kontraktur > 135° vorhanden ist (Tubiana et al., 1968). Hierbei wird die Hand in 5 Segmente aus dem jeweiligen Finger und dem korrespondierendem palmaren Handbereich eingeteilt. Dann werden die Flexionskontrakturen des Metacarpophalangeal-(MCP), proximalen und distalen Interphalangealgelenkes (PIP und DIP) des jeweiligen Fingers zusammengerechnet, wodurch sich das Stadium errechnet. Die Buchstaben „P“ und „D“ kennzeichnen, ob Läsionen palmar oder digital lokalisiert sind. „H“ steht weiterhin für Hyperextension, „N“ für Nodus, also ein Stadium der Erkrankung ohne Kontraktur, aber mit aponeurotischer Läsion (Tubiana et al., 1968, Tubiana, 1986) (Tab. 1).

**Tabelle 1: Tubiana-Klassifikation (Tubiana et al., 1968, Tubiana, 1986)**

Tubiana-Stadium	Definition
0/N	Knoten ohne Extensionsdefizit
I	Totales Extensions-Defizit (MCP+PIP+DIP) 0-45°
II	Totales Extensions-Defizit (MCP+PIP+DIP) 45-90°
III	Totales Extensions-Defizit (MCP+PIP+DIP) 90-135°
IV	Totales Extensions-Defizit (MCP+PIP+DIP) >135°

Frische Läsionen sind histologisch durch knotige Proliferationen von Spindelzellen gekennzeichnet, ältere Läsionen sind zellärmer und zeigen dichte Kollagenfasern (Böcker et al., 2012; S. 904f.). Die Erkrankung verläuft in drei Phasen: Während der ersten „proliferativen“ Phase entwickeln sich Knoten über den Metacarpophalangeal- und proximalen Interphalangealgelenken. Es folgt die Involutionsphase, zu deren Beginn die Knoten kontrahieren – Kollagenproduktion und

Myofibroblastengenes sind charakteristische Merkmale dieser Phase – und es entstehen Knoten-Strang-Komplexe. In der letzten Phase, der Residualphase, nimmt der Myofibroblasten-Anteil und die Gesamtzellzahl ab, sodass primär Kollagen übrig bleibt (Grazina et al., 2019). Das MD-Gewebe wird insgesamt von Myofibroblasten dominiert (Meister et al., 1978) und es sind erhöhte Level von Kollagen nachzuweisen (Kloen, 1999, Grazina et al., 2019). Charakteristisch ist eine Abnahme der Expression von Kollagen Typ I, woraus sich ein erhöhtes Verhältnis von Kollagen Typ 3 zu Typ 1 ergibt – dieses Phänomen ist wahrscheinlich auf die zunehmende Dichte von Fibroblasten in MD zurückzuführen (Murrell et al., 1991). Als Surrogatparameter für die Myofibroblasten eignet sich *α-smooth muscle actin* (*α-sma*) (Darby et al., 1990), dessen Expression auch durch *Transforming growth factor* (TGF)β-Zugabe induziert werden kann (Desmouliere et al., 1993). Weiterhin kann in MD-Fibroblasten *Extra domain A Fibronectin* (EDA-Fn) nachgewiesen werden (Kloen, 1999, Halliday et al., 1994), welches für die TGFβ-induzierte *α-sma*-Expression bzw. Myofibroblastendifferenzierung benötigt wird und selbst *α-sma*-Expression induzieren kann (Serini et al., 1998, Kohan et al., 2010). Die Bedeutung des TGFβ für die MD-Pathogenese wird insgesamt dadurch deutlich, dass Myofibroblastendifferenzierung unter anderem durch TGFβ induziert wird (Desmouliere et al., 1993). In MD-Gewebe ist TGFβ1 vermehrt nachzuweisen (Badalamente et al., 1996, Krause et al., 2011), und durch Zugabe des TGFβ-Rezeptor Inhibitors SB-431542 können die profibrotischen Eigenschaften unterbunden werden (Seßler, 2017, Krause et al., 2011). SB ist ein spezifischer Inhibitor der TGF-Rezeptoren *activin receptor-like kinase* (ALK) 5, 4 und 7, wobei die Behandlung mit Konzentrationen bis zu 10 µM keinen Einfluss auf die Zellviabilität zeigt (Laping et al., 2002, Inman et al., 2002, Callahan et al., 2002).

Es wurden bereits in anderen Arbeiten erhöhte Level reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowohl in MD-Gewebe (Murrell et al., 1987, Krassovka et al., 2019) als auch in Urin und Speichel von MD-Patienten (Nicula et al., 2014) gemessen. Es konnten profibrotische und -proliferative Eigenschaften der ROS nachgewiesen werden, dies lässt Rückschlüsse auf eine mögliche Beteiligung von ROS an der Pathogenese des MD zu: Die Zugabe von N-Acetyl-Cystein, welches antioxidativ wirkt, führt in MD-Fibroblasten zu einer Verringerung fibrotischer Marker, wie zum Beispiel der *α-sma*-Expression (Kopp et al., 2006), und die Inhibition der endogenen ROS-Produktion von Fibroblasten hemmt deren Proliferation (Murrell et al., 1990). Interessanterweise führt die Bestrahlung von MD-Zellen mit blauem Licht zu einer Abnahme des Myofibroblastenmarkers *α-sma* und einer Generierung von ROS (Krassovka et al., 2019). Diese Ergebnisse werfen die Frage nach der Beteiligung von ROS an Pathogenese des MD und an der therapeutischen Wirkung der Blaulicht-Bestrahlung auf.

Als Vergleichsgewebe dienen in dieser Arbeit, wie schon in mehreren vorangegangenen Versuchsreihen, Karpaltunnelsyndrom (CTS)-Fibroblasten, die aus Gewebeproben von Patienten mit Spaltung des Karpaldaches entnommen wurden. Bei dem CTS kommt es zur Kompression des Nervus medianus im Karpaltunnel, dessen Dach das Ligamentum Carpi transversum bildet. In der

Folge treten Schmerzen und Parästhesien der Hände sowie Atrophie der Daumenballenmuskulatur auf. Die Ursachen sind uneinheitlich: Frakturen, Luxationen, Arthritiden, Arthrosen und Stoffwechselerkrankungen (z. B. Gicht und Amyloidose) werden diskutiert. Es findet sich ein gehäuftes Auftreten bei Frauen in der Prämenopause, was auf hormonelle Faktoren hindeutet. Mechanische Ursachen, wie Mikrotraumen durch repetitive Bewegungen, sind als Ursache umstritten (Böcker et al., 2012; S. 894).

## **1.2 Fibroblasten und Myofibroblasten und ihre Bedeutung im Morbus Dupuytren**

Fibroblasten sind langlebige Zellen, die existenzielle Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) bilden und deren Menge und Zusammensetzung bestimmen. Fibroblasten befinden sich im Bindegewebe und in der Dermis und sind ubiquitär im Körper verteilt. Die Morphologie der Fibroblasten ist meist lang bzw. spindelförmig mit verzweigten Ausläufern, einem länglichen, heterochromatinreichen Zellkern und einem hochdifferenzierten Zytoskelett. Sie exprimieren Vimentin, Aktin und Myosin II. Fibroblasten sind motil und über Integrine mit Matrixkomponenten, wie z. B. Fibronectin, verbunden (Welsch et al., 2018; S. 117f.). Desmin und  $\alpha$ -sma werden in der Regel nicht von Fibroblasten exprimiert. Eine der Aufgabe, die Synthetisierung von Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM), umfasst die Produktion von Kollagen, Proteoglykanen, Fibronectin und Proteasen wie die Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die die EZM abbauen können (McAnulty, 2007).

Myofibroblasten wurden erstmals in den 1970er Jahren beschrieben und ihre Bedeutung für die Wundheilung aufgezeigt (Majno et al., 1971). Sie differenzieren sich primär aus Fibrozyten (inaktive Fibroblasten) und Fibroblasten, aber auch aus Endothelzellen, Epithelzellen (Epithelial-mesenchymale Transition) oder hepatischen Sternzellen (Ito-Zellen). Myofibroblasten besitzen charakteristische kontraktile Fasern und sezernieren große Mengen an extrazellulärer Matrix, die vermindert abgebaut wird (Böcker et al., 2012; S. 60). Die EZM besteht unter anderem aus Kollagenen, Glykoproteinen, Proteoglykanen, Laminin, Thrombospondin, Glykosaminoglykanen, Hyaluronsäure und die EZM regulierende Proteine wie MMP und *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* (TIMP) (Li und Wang, 2011). Myofibroblasten übernehmen eine wichtige Rolle bei Bindegewebsumbau und Wundheilung, sie dienen zum Beispiel der Wundkontraktion und bilden vermehrt Zell-Zell/Matrix Kontakte aus (Hinz und Gabbiani, 2003). Die Zellen sind ebenfalls assoziiert mit pathologischen Prozessen wie einer überschießenden Narbenbildung und Fibrose, bei der es zur Persistenz der Myofibroblasten kommt (Hinz et al., 2012, Desmoulière et al., 2003, Gabbiani et al., 1971). Auch in MD lassen sich vermehrt Myofibroblasten nachweisen (Meister et al., 1978).

Durch mechanischen Stress und Wachstumsfaktoren, wie zumeist TGF $\beta$ , kommt es in den Vorläuferzellen der Myofibroblasten zur Ausbildung primär aus Actin bestehender Stressfasern. Die nun als „Protomyofibroblasten“ bezeichneten Zellen können sich zu den  $\alpha$ -sma-positiven Myofibroblasten weiterentwickeln (Hinz et al., 2007, Darby et al., 2014). Diese Differenzierung zu Myofibroblasten kann durch TGF $\beta$  (Desmouliere et al., 1993, Vaughan et al., 2000), mechanischen Stress (D. Arora et al., 1999) und bestimmte Matrixproteine wie EDA-Fn, eine Spleißvariante des Fibronectins (Shinde et al., 2015, Kohan et al., 2010, Serini et al., 1998) getriggert werden (Hinz et al., 2007). Auch andere Einflussfaktoren, wie Hypoxie, können eine Differenzierung zu Myofibroblasten auslösen (Misra et al., 2010).

Myofibroblasten besitzen sowohl Eigenschaften von glatten Muskelzellen als auch Fibrozyten (Welsch et al.; S.170). Im Gegensatz zu Fibroblasten exprimieren sie jedoch  $\alpha$ -sma, weshalb sich dieses Protein als Surrogatparameter für Myofibroblasten anbietet (Darby et al., 1990). Weiterhin sind Myofibroblasten, wie glatte Muskelzellen, typischerweise untereinander über *Gap junctions* verbunden (Tomasek et al., 2002). Der sie von Fibroblasten unterscheidende kontraktile Apparat besteht aus Aktinbündeln mit kontraktile Proteinen (Myosin),  $\alpha$ -sma sowie EDA-Fn (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge, 1996, Kolodney und Elson, 1993). Das Protein  $\alpha$ -sma scheint daher für die kontraktile Eigenschaften der Myofibroblasten von Bedeutung zu sein (Hinz et al., 2001, Shinde et al., 2017). In vitro kann TGF $\beta$ 1 die  $\alpha$ -sma-Expression in Fibroblasten induzieren (Desmouliere et al., 1993), folglich eignet sich TGF $\beta$  für die experimentelle Induktion von Myofibroblasten.

### **1.3 Die Rolle des TGF $\beta$ in der Myofibroblastengnese**

TGF $\beta$  ist ein Wachstumsfaktor und fördert einerseits Fibroblastenproliferation, -differenzierung und Kollagen-Synthese, aber auch Inhibition der Proliferation (Roberts et al., 1985, Roberts et al., 1986, Tucker et al., 1984). In Säugetieren sind die Isoformen TGF $\beta$ 1, 2 und 3 beschrieben (Kubiczkova et al., 2012). Die Zugabe von TGF $\beta$ 1 kann die Expression des Myofibroblastenmarkers  $\alpha$ -sma induzieren und führt zu der Ausbildung struktureller Elemente in Myofibroblasten (Vaughan et al., 2000, Desmouliere et al., 1993, Darby et al., 1990). Weiterhin zeigt sich im Mausmodell, dass der Knock-Out von an der TGF $\beta$ -Signalkaskade beteiligten Molekülen die Ausbildung einer Fibrose verhindern kann (Bonniaud et al., 2004). TGF $\beta$ 1 ist folglich ein wichtiger Induktor der Myofibroblastendifferenzierung und an der Pathogenese fibrotischer Erkrankungen beteiligt. Dies zeigt sich unter anderem auch in der Nachweisbarkeit erhöhter TGF $\beta$ -Level in hypertrophen Narben (Leask und Abraham, 2004) und im MD (Badalamente et al., 1996, Krause et al., 2011).

Fibroblasten und Myofibroblasten sezernieren TGF $\beta$  als Teil eines latenten Komplexes, bestehend aus LAP (*latency-associated protein*) und dem LTBP-1 (*latent TGF $\beta$ 1-binding protein*) (Mangasser-Stephan et al., 2001, Koli et al., 2005). TGF $\beta$  wird zuerst mit dem LAP, welches sich aminoterminal befindet und für die Reifung des Proteins notwendig ist, als Propeptid synthetisiert – dieser Komplex

wird als *small latent complex* bezeichnet (Kubiczkova et al., 2012, Gray und Mason, 1990). Die Freisetzung dieses Propeptides erfolgt dann als *large latent complex*, in welchem der *small latent complex* an das Glykoprotein LTBP-1 gebunden vorliegt (Miyazono et al., 1988). TGF $\beta$  muss, um an seinen Rezeptor binden zu können, aus dem *large* und *small latent complex* gelöst werden (Annes et al., 2003). LTBP-1 verankert diesen Komplex in der EZM, und hier kann TGF $\beta$ 1 über z. B. Plasmin oder Thrombospondin-1 freigesetzt werden (Annes et al., 2003, Taipale et al., 1994, Crawford et al., 1998). Es sind jedoch alternative Wege der Aktivierung bekannt. LAP und LTBP-1 binden Integrine wie z. B.  $\alpha\beta$ 6 (Munger et al., 1999),  $\alpha\beta$ 3 (Ludbrook et al., 2003) und  $\alpha$ 8 $\beta$ 1 (Lu et al., 2003), und das epitheliale Integrin  $\alpha\beta$ 6 kann Protease-unabhängig TGF $\beta$  aktivieren (Annes et al., 2004, Munger et al., 1999). Sowohl die Integrine  $\alpha$ 8 $\beta$ 1 als auch  $\alpha\beta$ 3 und 5 sind hierbei mit fibrotischen Erkrankungen assoziiert (Asano et al., 2006, Asano et al., 2005, Bouzeghrane et al., 2004). Weiterhin ist auch TGF $\beta$ -Aktivierung durch ROS und ionisierende Strahlung bekannt (Barcellos-Hoff und Dix, 1996), wobei eine Oxidation des LAP mit anschließender Konformationsänderung ursächlich ist (Jobling et al., 2006). Die Oxidierung durch ROS findet nur bei dem LAP $\beta$ 1 statt, wahrscheinlich aufgrund eines Methionin-Restes dieser Isoform, wodurch ROS-induzierte Freisetzung von TGF $\beta$ 1 möglich wird (Jobling et al., 2006, Krstić et al., 2015).

In den meisten Zellen finden sich 3 Subtypen von TGF $\beta$ -Rezeptoren: TGF $\beta$ -R I, II oder III. Für MD sind TGF $\beta$ -R I und II von Bedeutung, bei denen es sich um transmembrane Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren handelt (Kubiczkova et al., 2012). ALK1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7 gehören zu den TGF $\beta$ -R I. Die Typ II-Familie umfasst TGF $\beta$ R2, BMPR2, ACVR2A/2B und AMHR2. TGF $\beta$ -R I enthalten eine zytoplasmatisch lokalisierte Glycin-Serin-Domäne, die für die Aktivierung phosphoryliert werden muss (Wrana et al., 1994, Kubiczkova et al., 2012). Im Zuge der Aktivierung des Signalweges bindet TGF $\beta$ -R II dimeres TGF $\beta$  und rekrutiert sowie phosphoryliert TGF $\beta$ -R I (Kubiczkova et al., 2012, Shi und Massagué, 2003). Regulatorische R-Smad binden den auf diese Weise aktivierten Typ I Rezeptor über das Protein SARA (*SMAD Anchor for receptor activation*) (Tsukazaki et al., 1998). Die Serin/Threonin-Kinase des Rezeptors aktiviert durch Phosphorylierung die Transkriptionsfaktoren Smad 2 sowie 3, die jeweils an Smad 4 binden und in den Zellkern transloziert werden. Hier findet eine Interaktion mit DNA-Transkriptionsfaktoren statt (Feng und Derynck, 2005, Massague et al., 2005). In den Signalweg kann regulierend eingegriffen werden: Smad 7 ist ein negativer Feedback-Inhibitor des TGF $\beta$ -Signalweges und vermittelt eine Inhibition von Smad 3, sodass es durch Überexpression von Smad 7 zu einer erniedrigten Expression profibrotischer Marker kommen kann (Yan et al., 2009, Wang et al., 2007, Flanders, 2004). Allerdings wird auch berichtet, dass TGF $\beta$  auch Smad-unabhängig die Differenzierung zu Myofibroblasten induzieren kann (Wilkes et al., 2005).

## 1.4 Der Einfluss der ROS auf die Pathogenese des MD

ROS haben diverse Funktionen und Einflüsse in der Zellphysiologie. Ihre Anwesenheit kann zu oxidativem Stress führen, und zu den möglichen Schäden gehören Strangbrüche der DNA, Fehlpaarungen sowie Mutationen ebenso wie Veränderungen der dreidimensionalen Proteinstruktur. ROS können weiterhin das aktive Zentrum von Enzymen modifizieren und somit deren Funktion empfindlich stören. Nicht nur Proteine, auch Kohlenhydrate und Lipide können durch Radikale verändert werden, ein Beispiel wäre die Lipidperoxidation. Oxidativer Stress entsteht überwiegend durch Ein-Elektronen-Reduktion von Sauerstoff zu  $O_2^-$  durch UV-Licht, Röntgen- und Gammastrahlen oder Autooxidation. Auch in physiologischen Zellreaktionen, wie der Atmungskette, oder durch die Aktivität verschiedener Enzyme entstehen ROS wie Superoxid ( $O_2^-$ ) oder das weniger reaktive Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Aus diesem Grund werden Schutz- und Entgiftungsmechanismen benötigt. Einerseits ist es möglich, die ROS nicht-enzymatisch über Antioxidantien oder Abbau geschädigter Moleküle zu entfernen, auf der anderen Seite verfügt der Organismus zum Abbau der ROS über enzymatische antioxidative Redoxsysteme, wie die Katalase, Glutathionperoxidase, zytoplasmatische CuZn-Superoxiddismutase SOD1 und die mitochondriale Mn-Superoxiddismutase SOD2 (Heinrich et al., 2014; S. 254 ff.).

ROS besitzen zwar schädliche Eigenschaften, sie sind jedoch auch ein essenzieller Bestandteil der Immunabwehr und Homöostase: ROS werden von Immunzellen als Abwehrmechanismus produziert, sie dienen als Signalmoleküle und greifen in den Zellmetabolismus ein (Finkel und Holbrook, 2000). Zellen können enzymatisch, wie z. B. durch die NOX4, eine NADPH-Oxidase, selbst ROS produzieren (Murrell et al., 1990, Richter und Kietzmann, 2016). ROS interagieren mit wichtigen Signalwegen innerhalb der Zelle, z. B. den p53- und NFκB-Signalkaskaden, und beeinflussen unter anderem Zellproliferation, Apoptose sowie weitere physiologische, jedoch auch pathologische Vorgänge (Finkel und Holbrook, 2000). Die Wirkung der ROS scheint hierbei auch von der Dosis abzuhängen, ein Phänomen, welches als Hormesis bezeichnet wird: geringe Dosen einer schädlichen Substanz können „positive“ Effekte auf den Organismus haben, in diesem Fall z. B. vermehrte Zellproliferation statt Apoptose, wie es bei Fibroblasten gezeigt werden konnte (von Zglinicki et al., 1995, Murrell et al., 1990). Es wurde bereits demonstriert, dass es eine Verbindung zwischen fibrotischen Erkrankungen und ROS gibt (Richter und Kietzmann, 2016). In einer primären Lungenfibrose zum Beispiel konnten durch ROS ( $200 \mu M H_2O_2$ )  $\alpha$ -sma und Typ I Kollagen induziert werden, was einer Differenzierung in Myofibroblasten entspräche (Bocchino et al., 2010). Weiterhin sind durch die NOX4 erhöhte ROS-Level mit der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten in Zusammenhang gebracht worden (Barnes und Gorin, 2011). Murrell et al. postuliert, dass ROS auch für die Pathogenese des MD eine entscheidende Rolle spielen (Murrell et al., 1987). Tatsächlich konnte in MD-Gewebe erhöhte Level von Hypoxanthin, was in weiterem

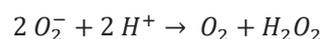
Verlauf zu vermehrten ROS führt, nachgewiesen werden (Murrell et al., 1987), und es finden sich Zeichen oxidativer Dysbalance in Speichel und Urin von MD-Patienten (Nicula et al., 2014).

Zwischen ROS und TGF $\beta$  besteht eine wechselseitige Beziehung – TGF $\beta$  kann ROS induzieren, ROS wiederum die Wirkung des TGF $\beta$  verstärken (Richter und Kietzmann, 2016, Liu und Desai, 2015). Beispielsweise induziert TGF $\beta$  in humanen pulmonalen Fibroblasten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und mitochondriale ROS-Produktion (Jain et al., 2013) und erhöht die NOX4-Expression in glatten Muskelzellen der Atemwege (Michaeloudes et al., 2011). ROS können wiederum die TGF $\beta$ -Aktivierung vermitteln (Barcellos-Hoff und Dix, 1996). Es wird vermutet, dass es durch ROS zur Oxidation und Konformationsänderung des LAP kommt, sodass das LAP TGF $\beta$ 1 nicht mehr bindet, welches folglich frei verfügbar wird (Jobling et al., 2006). Wenn TGF $\beta$  und Antioxidantien (wie N-Acetyl-Cystein (NAC)) zu dermalen Fibroblasten hinzugegeben werden, findet keine TGF $\beta$ -induzierte  $\alpha$ -sma-Expression statt, was darauf hinweist, dass entstehende ROS für die Myofibroblastendifferenzierung essenziell sind (Murphy-Marshman et al., 2017). Auch die Zugabe von NAC zu MD-Fibroblasten erniedrigt die  $\alpha$ -sma-Expression (Kopp et al., 2006). All dies unterstreicht die Annahme einer wichtigen Rolle von ROS in der Pathogenese fibrotischer Erkrankungen und MD.

ROS sind jedoch nicht nur an der Pathogenese des MD beteiligt. Bei Blaulicht-Bestrahlung entstehen ROS in dermalen Fibroblasten (Taflinski et al., 2014, Mamalis et al., 2015, Opländer et al., 2011). Es konnte demonstriert werden, dass es in isolierten Mitochondrien aus epithelialen Zellen zur Produktion von Superoxiden, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und singulärem Oxygen durch blaues Licht kommt (Godley et al., 2005). Die Zugabe von Resveratrol, einem Antioxidans, konnte die Effekte des blauen Licht auf dermale Fibroblasten inhibieren, was darauf hindeutet, dass die Entstehung von ROS für die Wirkung des blauen Lichtes essenziell sein könnte (Mamalis et al., 2016). Es ist daher von Interesse, ob ROS nicht nur negative Effekte, wie die Fibrose, sondern auch positive Effekte, wie die antifibrotische Wirkung des blauen Lichtes, modulieren, und wie diese ROS generiert werden könnten. Eine mögliche Quelle stellen diverse ROS-modulierende Enzyme dar.

#### ***1.4.1 Rolle der ROS-modulierende Enzyme und Transkriptionsfaktoren***

Die SOD1 (CuZn-Superoxiddismutase) ist im Zytoplasma lokalisiert und baut Superoxidanionen ab (Sea et al., 2015), dargestellt in folgender Gleichung.

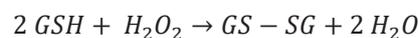


Hierbei ist darauf hinzuweisen, dass durch Superoxiddismutasen ROS in Form von O<sub>2</sub><sup>-</sup> abgebaut werden, jedoch andere ROS in Form von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entstehen. Die SOD1 scheint in humanen dermalen Fibroblasten durch oxidativen Stress inhibiert zu werden (Strålin und Marklund, 1994). In Ratten-Zellen kann die Expression der SOD1 jedoch durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert werden (Yoo et al., 1999), was durch NF $\kappa$ B moduliert zu werden scheint (Rojo et al., 2004). Die TGF $\beta$ -induzierte Proliferation und

Kontraktion kann in humanen Myofibroblasten durch Zugabe der SOD1 inhibiert werden (Mattyasovszky et al., 2016), was auf eine Rolle der SOD1 während der Myofibroblastengnese hinweist. Besonders interessant ist, dass die Applikation von Gel mit enthaltener humaner SOD bei Patienten mit Indurata penis plastica, einer dem MD ähnlichen Erkrankung, einen lindernden Effekt erzielen konnte (Reduktion der Schmerzen und Reduktion der Größe der Läsion) (Riedl et al., 2001, Riedl et al., 2005).

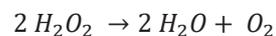
Die SOD2 (Mn-SOD) katalysiert die gleiche Reaktion wie die SOD1, ist jedoch in den Mitochondrien lokalisiert (Pias et al., 2003). In glatten Muskelzellen konnte demonstriert werden, dass TGF $\beta$  die Expression der Mn-SOD inhibieren kann (Michaeloudes et al., 2011), wodurch oxidativer Stress in Form von O $_2^-$  induziert werden könnte. Die Mn-SOD-Expression kann in Fibroblasten durch oxidativen Stress (Strålin und Marklund, 1994) und in pulmonalen Adenokarzinom-Zellen durch H $_2$ O $_2$  induziert werden (Warner et al., 1996). Interessanterweise führte die Deletion der Mn-SOD in *Caenorhabditis elegans* zu einer verlängerten Lebensspanne (Van Raamsdonk und Hekimi, 2009). Eine verstärkte Mn-SOD-Expression in murinen Myokardzellen scheint dagegen vor oxidativem Stress, Fibrosierung und proapoptotischen Signalen zu schützen (Kwak et al., 2015).

H $_2$ O $_2$  gehört als stabiles molekulares Oxidantium zu den ROS und kann unter anderem durch die Glutathionperoxidase und die Katalase weiter enzymatisch prozessiert werden. Die GPX wurde 1957 entdeckt und katalysiert die folgende Reaktion (Mills, 1957):



GSH stellt das reduzierte Glutathion, GS-SG das Glutathiondisulfid dar. Die Glutathion-Reduktase reduziert das Glutathiondisulfid, sodass das Glutathion regeneriert wird.

Die Katalase wurde 1900 erstmalig beschrieben und vermittelt ebenfalls den Abbau von Wasserstoffperoxid (Loew, 1900):



Es ist bereits bekannt, dass die Katalase durch Licht beeinflusst werden kann: in humanen dermalen Fibroblasten sowie Eichhörnchen- und Kaninchengewebe wird sie durch UVA-Bestrahlung inaktiviert bzw. inhibiert (Shindo und Hashimoto, 1997, Zigman et al., 1996). Katalase- und GPX-Expression scheinen durch ROS reguliert zu werden, da sie NF $\kappa$ B-moduliert durch H $_2$ O $_2$  in Muskelzellen induziert werden (Zhou et al., 2001, Franco et al., 1999).

Ein weiteres ROS-modulierendes Enzym ist die NOX4, die H $_2$ O $_2$  (Martyn et al., 2006, Takac et al., 2011) und Superoxidanionen (O $_2^-$ ) produzieren kann (Heinrich et al., 2014; S. 889). Hierbei wird Sauerstoff unter Zuhilfenahme von NADPH zu O $_2^-$  reduziert. Die NOX4 vermittelt in verschiedenen

Gewebe die TGF $\beta$  induzierte Myofibroblastendifferenzierung (Bondi et al., 2010, Cucoranu et al., 2005, Hecker et al., 2009, Jiang et al., 2014b) und es konnte demonstriert werden, dass die Inhibition der NOX4 in dermalen und gingivalen Fibroblasten die  $\alpha$ -sma Induktion durch TGF $\beta$  unterbindet (Murphy-Marshman et al., 2017). Weiterhin ist eine Hochregulation der NOX4-Expression in Hepatozyten (Carmona-Cuenca et al., 2008) und glatten Muskelzellen der Atemwege (Michaeloudes et al., 2011) durch TGF $\beta$  bekannt. Auch in pulmonalen Zellen wurde die NOX4 durch TGF $\beta$  induziert und für die Differenzierung zu Myofibroblasten benötigt (Hecker et al., 2009). Insgesamt moduliert die NOX4 die fibrotischen Prozesse (Chan et al., 2013, Cucoranu et al., 2005) und bisherige Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle in der Pathogenese fibrotischer Erkrankungen hin (Barnes und Gorin, 2011, Bondi et al., 2010, Jiang et al., 2014a).

Auch die Transkriptionsfaktoren  $\beta$ -Catenin, beteiligt am WNT-Signalweg, und NF $\kappa$ B sind an der Regulation der ROS und fibrotischer Erkrankungen beteiligt.  $\beta$ -Catenin liegt normalerweise durch Kinasen phosphoryliert im Zytoplasma vor, wird ubiquitiniert und abgebaut. Bindet nun der Wnt-Ligand, wird die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors unterbunden und  $\beta$ -Catenin so stabilisiert. Dieses sammelt sich im Zytoplasma, diffundiert in den Nucleus und führt dort zur Transkription. Dies ist der kanonische Wnt-Signalweg (Clevers und Nusse, 2012). Die  $\beta$ -Catenin-Expression wird durch TGF $\beta$  in Fibroblasten induziert (Amini Nik et al., 2007) und in fibroproliferativen Erkrankungen, wie dem MD, wurden vermehrt posttranslationale Veränderungen des  $\beta$ -Catenins gefunden, die mit zytoplasmatischer Akkumulation assoziiert sind (Bowley et al., 2007). Darüber hinaus lassen sich im MD-Gewebe erhöhte Expressionslevel von  $\beta$ -Catenin nachweisen (Howard et al., 2003, Varallo et al., 2003b, Ten Dam et al., 2016).  $\beta$ -Catenin ist in der Vermittlung des wundheilenden Effektes von TGF $\beta$  involviert (S Cheon et al., 2006) und auch für die Myofibroblastendifferenzierung durch TGF $\beta$  ist die Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin Signalwegs erforderlich (Xu et al., 2017).

NF $\kappa$ B ist an der Regulation von Apoptose, Stressreaktionen, Entzündungsprozessen und an Proliferation sowie Differenzierung beteiligt (Siomek, 2012). Singuläres Sauerstoff und auch UVA-Bestrahlung von humanen Fibroblasten aktivieren NF $\kappa$ B (Vile et al., 1995, Reelfs et al., 2004, Volanti et al., 2002). Durch ROS-abhängige Oxidation kann jedoch die DNA-Bindfähigkeit des Transkriptionsfaktors und damit dessen Wirkung auch herabgesetzt werden (Toledano und Leonard, 1991). NF $\kappa$ B ist weiterhin involviert in die Regulation der antioxidativ wirksamen Enzyme: der Transkriptionsfaktor ist beteiligt an der Induktion der GPX-, Katalase- und SOD1-Expression durch ROS (Franco et al., 1999, Zhou et al., 2001, Rojo et al., 2004) und der Induktion der Mn-SOD-Expression durch Antioxidantien oder *x chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein* (Murley et al., 2001, Kairisalo et al., 2007).

## 1.5 Therapieoptionen des Morbus Dupuytren

Die Behandlung des MD erfolgt stadienabhängig. Allgemein wird in Stadium 0 nach Tubiana Zuwarten, Aufklärung und Beobachtung empfohlen, in Stadium I und II kann auf eine perkutane Nadelfasziotomie zurückgegriffen werden, in Stadium III und IV eine partielle Fasziektomie (Bundesvereinigung, 2012). Als Nicht-Operative Verfahren für die Therapie des MD bieten sich Massage, Schienung oder Radiotherapie an (Kadhun et al., 2017, Christie et al., 2012, Larocerie-Salgado und Davidson, 2012), wobei der Langzeiterfolg kontrovers diskutiert wird und größere Studien zur Einschätzung fehlen (Eaton, 2014). Eine weitere Möglichkeit stellt die Injektion von Kollagenase zur enzymatischen Zersetzung des Kollagenstranges dar. Es fehlen jedoch auch hier Langzeitstudien (Sanjuan-Cervero, 2019), und ein Wiederauftreten der Erkrankung ist häufig (Van Beeck et al., 2017). Die perkutane Nadelfasziotomie ist eine weitere, wenig invasive Therapieoption, bei der das strangartig veränderte Gewebe mittels perkutaner Stiche mit geschliffenen Kanülen durchtrennt wird. Dieses Verfahren eignet sich tendenziell für ältere Patienten mit Kontrakturen einzelner Fingerstrahlen an, birgt jedoch ein höheres Rezidivrisiko und kann zu Nervenverletzungen führen (van Rijssen et al., 2012). *Extensive Percutaneous Aponeurotomy and Lipografting* ist eine Behandlungsmöglichkeit, bei der unter kontinuierlicher Spannung die Stränge selektiv angeschnitten werden und subkutan Lipoaspirat injiziert wird (Hovius et al., 2011). Die Therapie gilt als sicher und wenig invasiv, die Rückfallrate nach 1 Jahr korrespondiert mit der nach offener Operation (Hovius et al., 2015). Ähnliche Methoden sind die Fasziotomie und die segmentale Fasziektomie (Dumont et al., 2011).

Die bevorzugt angewandte operative Methode ist die limitierte bzw. partielle Fasziektomie, bei der nur das befallene Gewebe anstelle der gesamten Aponeurose (wie bei der totalen Fasziektomie) entfernt wird. Zielsetzung ist hierbei eine bestmögliche Korrektur der Kontraktur (Henry, 2014). Weitere Möglichkeiten, z. B. nach totaler Fasziektomie, sind die open-palm-Technik mit Belassung eines Hautdefektes oder die Dermatofasziektomie mit Vollhautdeckung, anwendbar unter anderem bei schweren Rezidiven. In therapierefraktären Fällen oder bei terminal kontrakten, funktionsunfähigen Gelenken kann eine Amputation des betroffenen Strahles eine sinnvolle und für den Patienten entlastende Alternative sein (Dumont et al., 2011). Tendenzuell zeigt die partielle Fasziektomie, bezogen auf Beseitigung der Kontraktur und Rezidivrate sowie -ausmaß, eine bessere Wirksamkeit als die weniger invasiven Methoden (Nadelfasziotomie und Kollagenaseinjektion), welche jedoch komplikationsärmer sind (Henry, 2014, Chen et al., 2011). Als Komplikationen werden nach (partieller) Fasziektomie Infektionen (4 - 12 %), regionales Schmerz-Syndrom (2 - 13 %), Nervendurchtrennung (2 - 5 %) und Neurapraxie (0,4 - 52 %) beschrieben, nach Nadelfasziotomie oder Kollagenaseinjektion Einrisse der Haut (9 - 25 %), aber ebenso Auftreten von Nervenläsionen sowie die Entwicklung eines regionalen Schmerzsyndromes (Chen et al., 2011).

Ein Problem in Bezug auf die Behandlung des Morbus Dupuytren ist das Wiederauftreten der Erkrankung: Es wird von Rezidivraten bis zu 33 % (Totale Fasziektomie) und 17 % (Partielle Fasziektomie) berichtet (Constantinou und Deutinger, 1996). In einem Review von 2011 werden Rezidivraten von 12 - 39 % nach partieller Fasziektomie, 50 - 58 % nach Nadelfasziotomie, und 10 - 31 % nach Kollagenase-Injektion angegeben (Chen et al., 2011). Auch aktuellere Untersuchungen bestätigen, dass nach Fasziektomie die niedrigsten Rezidivraten zu erwarten sind (Leafblad et al., 2019).

## **1.6 Blaues Licht als Therapieoption des Morbus Dupuytren**

Sowohl in humanen dermalen Fibroblasten (Taflinski et al., 2014) als auch MD-Fibroblasten (Krassovka et al., 2019) konnte die Bestrahlung mit blauem Licht als Inhibitor der TGF $\beta$ -induzierten Zunahme der  $\alpha$ -sma-Expression identifiziert werden (Krassovka, 2017, Borgschulze, 2016). Dies deutet auf einen möglichen therapeutischen Effekt der Bestrahlung hin, da ein Rückgang der Myofibroblastendifferenzierung demonstriert werden konnte. Auch wird blaues Licht bereits in der Therapie dermatologischer Erkrankungen wie Akne (Wheeland und Koreck, 2012, Gold et al., 2011), Psoriasis (Pfaff et al., 2015) und atopischer Dermatitis (Becker et al., 2011) eingesetzt, kann jedoch unter anderem eine Photoretinopathie auslösen, weshalb auf entsprechende Schutzmaßnahmen zu achten ist (Okuno, 2008).

Das für das menschliche Auge sichtbare Licht, elektromagnetische Strahlung, hat eine Wellenlänge im Bereich von 400 - 780 nm. Es gibt weitere Wellenlängenbereiche, die für das menschliche Auge unsichtbar sind, wobei hier die Ultraviolett (UV)- (100 - 400 nm) und Infrarotstrahlung (780 - 1440 nm) hervorzuheben sind. Die auf der Erde eintreffende Strahlung besteht aus 3 - 7 % UV-Strahlung, 53 % Infrarotstrahlung und 44 % sichtbarem Licht. Die UV-Strahlung wird weiterhin in UVB- (280-315 nm), UVC- (100 - 280 nm) und UVA-Strahlung (315 - 400 nm) gegliedert, wobei die die Erdoberfläche erreichende UV-Strahlung größtenteils aus UVA-Strahlung besteht (Svobodova et al., 2006, Frederick et al., 1989, Mahmoud et al., 2008). Strahlung kann auf verschiedene Weisen Einfluss auf den Organismus nehmen. Photonen treffen auf die Haut und werden dort unter anderem von Chromophoren oder Photosensibilisatoren absorbiert. Durch die Absorption können direkt licht-induzierte Reaktionen gestartet werden, oder Moleküle werden durch die Absorption eines Photons und Umverteilung der Elektronen in einen angeregten Zustand überführt (sogenannter *excited singlet state*). In dessen Folge können Fluoreszenzsignale oder Wärme emittiert werden, oder es kommt zu Reaktionen oder Umwandlung in den langlebigen *triplet excited state*. In diesem angeregten Zustand kann es zu indirekten Schädigungen kommen, welche in Typ I und II unterteilt werden können. Bei Typ I kommt es zu einem Elektronentransfer zwischen dem angeregten Molekül und anderen Molekülen, sodass es zur Radikalformung ohne Benötigung von Sauerstoff kommt. Bei dem Typ II findet ein Energietransfer zwischen dem angeregten Molekül und molekularem Sauerstoff statt, sodass ROS entstehen (Svobodova et al., 2006, Pattison und Davies, 2006). Auch blaues Licht kann sowohl

in humanen dermalen Fibroblasten als auch MD-Fibroblasten ROS-Generierung zur Folge haben, weiterhin erhöht die Bestrahlung mit blauem Licht die Anfälligkeit humaner dermalen Fibroblasten für Wasserstoffperoxid-Toxizität (Mamalis et al., 2015, Krassovka et al., 2019, Taflinski et al., 2014, Opländer et al., 2011). Epithelzellen zeigen ebenso eine Generierung von ROS in Folge der Bestrahlung mit blauem Licht, und es lassen sich mitochondriale DNA-Läsionen nachweisen (Godley et al., 2005). Hierbei ist anzumerken, dass die Bestrahlung dermalen Fibroblasten mit Wellenlängen von 410 – 430 nm in hohen Dosen zu einer Verringerung der Zellzahl führt, bei 453 nm jedoch keine toxischen Effekte nachgewiesen werden (Opländer et al., 2011, Krassovka et al., 2019, Liebmann et al., 2010). Zusammenfassend stellt sich die Frage, ob entstehende ROS den möglichen therapeutischen Effekt des blauen Lichtes modulieren.

## 1.7 Ziele der Arbeit

Auf Grundlage der bisherigen Erkenntnisse zum MD und der Bestrahlung lassen sich folgende Fragestellungen zusammenfassen, die im Zuge dieser Arbeit bearbeitet werden sollten:

1. Obwohl erhöhte ROS-Level mitverantwortlich für die erhöhte Myofibroblastengenes im MD beschrieben werden, kommt es bei Bestrahlung mit blauem Licht zu einer Inhibition der  $\alpha$ -sma-Expression. Hier könnten bei der Bestrahlung induzierte ROS verantwortlich sein. Sind ROS in der Lage, den TGF $\beta$ -vermittelten Effekt der Myofibroblastendifferenzierung, definiert als Induktion von  $\alpha$ -sma, zu inhibieren?

Zur Überprüfung der Hypothese, ob ROS zu einer Inhibition der Myofibroblastendifferenzierung führen könnten, wurden TGF $\beta$ -behandelte MD-Fibroblasten mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde die  $\alpha$ -sma-Expression mittels Western Blot zwischen behandelten Zellen und Kontrollgruppen verglichen. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, ob ROS tendenziell die Myofibroblastendifferenzierung, essenziell für die MD-Pathogenese, verhindern können.

2. Welche Enzyme könnten an der Entstehung der in unbehandelten MD-Fibroblasten nachweisbaren erhöhten ROS-Level beteiligt sein? Welche Enzyme werden durch die Bestrahlung beeinflusst und könnten für die bestrahlungsassoziierte ROS-Generierung verantwortlich sein?

Um die in Frage kommenden enzymatischen ROS-modulierenden Systeme und mit ihnen interagierende Transkriptionsfaktoren zu untersuchen wurden MD mit CTS mit und ohne TGF $\beta$ -Behandlung und/oder Bestrahlung verglichen. Die Expressionsanalyse der Enzyme erfolgt mittels Western-Blot. Als mögliche Ursache kommen enzymatische Systeme in Frage, die ROS produzieren oder abbauen.

3. Ist eine Inhibition der Myofibroblastendifferenzierung, wie durch Bestrahlung mit blauem Licht, auch pharmakologisch durch TGF-Inhibition möglich und wie beeinflusst diese die ROS-assoziierten Systeme?

Zuerst wurden zur Klärung dieser Frage MD mit CTS-Fibroblasten mittels FACS-Analyse verglichen, um mögliche Veränderungen der TGF $\beta$ -Rezeptor-Expression darzustellen. Da postuliert wird, dass ROS, mittels Enzym-Expressionsveränderung, die MD-Pathogenese und den Effekt blauen Lichtes vermitteln, stellt sich die Frage, ob es eine Interaktion zwischen SB-431542, ROS-modulierenden Enzymen und letztendlich ROS gibt. Um zu der Hypothese, dass TGF $\beta$ -Inhibition auch eine Veränderung der Expression ROS-modulierender Enzyme hervorrufen könnte, nähere Erkenntnisse zu gewinnen, wurden die Zellen mit TGF $\beta$  und SB-431542 behandelt, um die Expression der Enzyme mittels Western Blot zu analysieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten und Probenmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Biomaterialien beinhalten zum einen Bindegewebe der Hand von Patienten mit Morbus Dupuytren (MD) und zum anderem von Patienten mit Karpaltunnelsyndrom (CTS). Aus den Patientenproben wurden spezifische Gewebszellen (Fibroblasten) isoliert, kultiviert und analysiert. Das MD- oder CTS-Gewebe wurde im Rahmen medizinisch notwendiger Operationen in der Klinik für Unfall- und Handchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf gewonnen. Die Patienten oder gesetzliche Vormünder stimmten der wissenschaftlichen Verwendung des Gewebes schriftlich zu. Das Durchführen der Versuche und Sammeln der Gewebeprobe wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Studiennummer 5882R geprüft und bewilligt. Es haben insgesamt 25 Männer (18 MD und 7 CTS, Durchschnittsalter 63 Jahre) und 11 Frauen (1 MD und 10 CTS, Durchschnittsalter 57) teilgenommen. Geschlecht, Alter und Verwendung in den unterschiedlichen Versuchen ist der Spenderliste zu entnehmen, „Anhang II: Spenderliste“.

### 2.2 Materialien

**Tabelle 2: Materialien**

Material	Produktbezeichnung	Produzent
6 / 12 Well Cellstar Multi Well Cell Culture Plate	6 and 12 well plate, cell culture treated, with lid, lid with condensation ring, sterile	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
15 / 50 ml Cellstar Centrifuge Tubes	15- and 50 ml tubes, sterile, graduation and writing area	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Abwurfbeutel	Vernichtungsbeutel 200 x 300 mm, PP, transparent, Stärke: 50 µm, autoklavierbar, ohne Druck	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Aluminiumständer zur kühlen Probenlagerung	Rotilabo-Alu.Rack 1.5	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Autoklav	Laboklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, DE
Autoklav	Systeme DX-90	Systeme GmbH, Linden, DE
Bechergläser	DURAN Becher niedrige Form und Ausguss	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, DE
Brutschrank (37 °C)	Heraeus B 6060	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Brutschrank (37 °C; 5 % CO <sub>2</sub> )	HERACELL 150i CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Casting Frames / Stands	Mini-PROTEAN Casting Frame / Stand	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Einweg-Wägeschalen	Diamond weighing boats, white, antistatic	vwr International GmbH, Darmstadt, DE

Material	Produktbezeichnung	Produzent
Eismaschine	RF 0244 A	Manitowoc Ice, Manitowoc, USA
Eiswanne zur kühlen Probenlagerung	neoLab Eisbad klein aus PS, innen 210 x 140 x 80 mm	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE
Elektrophorese Kit	Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell, 4-gel, for 1.0 mm thick handcast gels	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Elektrophorese Spannungsquelle	PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
FACS-Gerät	BD FACSCalibur	Becton Dickinson GmbH, BD Biosciences, Heidelberg, DE
Folie	Microtiter Sealing Tape	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Fusselarme Papiertücher	KIMTECH SCIENCE* Präzisionstücher weiß/klein	Kimberly-Clark Global Sales Inc., Roswell, USA
Gasflamme	Fuego SCS basic	WLD-Tec, Göttingen, DE
Gefrierschrank -20 °C	LIEBHERR GUw 1213	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, DE
Gefrierschrank -25 °C	Labor-Gefrierschrank FROSTER	Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, DE
gläserne Pasteurpipetten	Glass Pasteur Pipettes	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Glasplatten (0,75 mm)	Mini-PROTEAN short plates with 0.75 mm integrated spacers	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Handschuhe	Micro-Touch Nitra-Tex Nitrile Powder- Free Examination Gloves	Ansell GmbH, München, DE
Handschuhe	Classic Nitrile, Powder-Free, blau	Abena GmbH, Zörbig, DE
Heizblock	dry bath	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Hybridisation Oven	Hybridisierungsinubator Biometra OV3	Biometra GmbH - Analytik Jena AG, Jena, DE
Kühlschrank 4 °C	LIEBHERR KUw 1740	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, DE
Kühlschrank 4 °C mit Glastür	QCR2304U14	Queue Systems Inc., Asheville, USA
Kryoröhrchen	Cryo.s	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Laborflasche	DURAN Original Laborflasche	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, DE
Magnetrührgerät	620 Standard	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Mehrfachdispenser	Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Messbecherglas	Pyrex Beakers, low form, Griffin	SciLabware Ltd., Stoke- on-Trent, UK
Messzylinder	Messzylinder, PP, Klasse B, niedere Form, erhabene Skala	VITLAB GmbH, Grossostheim, DE

Material	Produktbezeichnung	Produzent
Messzylinder	Borosilikatglas 3.3, niedrige Form, Klasse B oder PP, durchscheinend, hohe Form, Klasse B	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf Safe-Lock tubes	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Mikroskop	Axiovert 40 C	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Mikrotiterplatte	Microplate, 96 well, PS, F-Bottom, Clear	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Papiertücher	TAPIRA Plus Kosmetiktücher	GVS Großverbraucher-spezialisten eG, Heidenheim, DE
Petri-Schale	TC-Schale 100, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
pH-Meter	HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments Inc., Woonsocket, USA
Photometer	multilabel plate reader Victor3	Perkin Elmer Inc., Waltham, USA
Photometer PC	Optiplex GX620	Dell Inc., Round Rock, USA
Pipetten (0,5 - 10 µl, 2 - 20 µl, 10 - 100µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)	eppendorf research/research plus/reference	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipettierhilfe	accu-jet pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
Pipettierhilfe	Omega Pipettor	Argos Technologies Inc., Vernon Hills, USA
Prototyp LED (light-emitting diode)	Prototyp LED (light-emitting diode) 453 nm	Phillips Innovative Technologies, Aachen, DE
Pumpe	LABOPORT	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, DE
Rüttelplatte	Kleinschüttler KM-2	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, DE
schwarze Tonne	Kontaminationsabfall	MAUSER Corporate GmbH, Brühl, DE
Sicherheitswerkbank mit Abzug	TA 1500 x 900 - 900 (Laborsystem mc6)	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, DE
Sonifizierer	UP50H (Cycle 0,5; Amplitude 80%) mit Sonotrode MS1	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, DE
Spannungsquelle Blaulichlampe (Prototyp LED)	Keithley 2602 System SourceMeter 453 nm	Keithley Instruments Inc, Ohio, USA
Spitzen 10 / 20 / 1000 µl	10 / 20 / 1000 µl XL Graduated Tip/Filter Tip	STARLAB GmbH, Hamburg, DE
Spitzen 200 µl	200µl Bevelled Tip/Filter Tip	STARLAB GmbH, Hamburg, DE

Material	Produktbezeichnung	Produzent
Spritzflasche	Nalgene belüftete Unitary LDPE-Sicherheits-spritzflaschen	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Spritzflasche	Weithals-Spritzflaschen Serie 303 LDPE, rund, naturfarben, mit Gefahrgutaufdruck	KAUTEX TEXTRON GmbH & Co. KG, Bonn, DE
sterile Werkbank	Herasafe KS 18	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
sterile Werkbank	Euroflow EF5E	Clean Air Technik bv, Woerden, NL
Sterilfilter	Millex-GS, Sterile Filter Unit with MF-Millipore MCE Membrane, 0,22 µm	Merck Millipore Ltd., Cork, IE
Stickstofftank	Model 8207 P.O. box 649 Marietta OH 45750 USA	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Stripetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	costar stripette serological pipet	Corning Inc., Corning, USA
Taumelrollenmischer	Multi-Axle-Rotating-Mixer, RM 5 / RM 10 W	Ingenieurbüro CAT M.Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen, DE
Thermostat für Wasserbad	Thermomix BU	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Transblot	Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Verschlussfolie	Parafilm "M"	Bemis Company Inc., Neenah, USA
Vortexer	IKA MS3 basic (3000 U/min)	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen, DE
Vortexer	Vortex mixer	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Vortexer	Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, DE
Waage (d = 0,1 mg)	ABJ 220-4M	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE
Waage (d = 10 mg)	Adventurer Pro AV412	Ohaus Corporation, Pine Brook, USA
Wärme-Bad 37 °C	Aqualine AL 12	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG, Lauda-Königshöfen, DE
Western Blot Imaging Instrument	ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Zählkammer / Hämocytometer	Neubauer, Tiefe 0,1mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshöfen, DE
Zellschaber	Cell Lifter, Polyethylene, sterile	Corning Inc., Corning, USA
Zentrifuge Megafuge	Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Zentrifuge Fresco	Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Zentrifuge MiniSpin	MiniSpin	Eppendorf AG, Hamburg, DE

**Tabelle 3: Software**

Software	Produktbezeichnung	Produkt
FACS Software CellQuest Pro	BD CellQuest Pro Software Version 6.0	Becton Dickinson GmbH, BD Biosciences, Heidelberg, DE
Office-Paket	Microsoft Office 2010 (Office Professional Plus) und Microsoft Office 2016 (Office 365 Pro Plus)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Photometer Software	WorkOut 2.0	DAZDAQ LTD., Brighton, UK
Statistik Software GraphPad Prism	GraphPad Prism Version 5.01, 2007 für Windows	GraphPad Software, San Diego California, USA
Western Blot Software ImageLab	Image Lab Version 6.0.1 build 34, 2017, Standard Edition	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA

**Tabelle 4: Substanzen**

Substanz	Produktbezeichnung	Produzent
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	HEPES solution, 1 M, pH 7.0 - 7.6, sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	HEPES buffer, 1 M, sterile-filtered	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
$\alpha$ -smooth muscle actin Antikörper	anti-alpha smooth muscle actin antibody [1A4] (ab7817)	abcam, Cambridge, UK
$\beta$ -Catenin Antikörper	anti-beta catenin antibody KO tested (ab16051)	abcam, Cambridge, UK
Albumin	Albumin Fraktion V, $\geq 98$ %, pulv., für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
ALK-3 Antikörper	anti-hBMPRII/ALK3 PE-conjugated, CatNo. FAB346P	R&D Systems, Inc., a biotechnne brand, Minneapolis, USA
ALK-7 Antikörper	anti-human ALK-7 APC-conjugated, CatNo. FAB77491A	R&D Systems, Inc., a biotechnne brand, Minneapolis, USA
Ammonium Persulfat (APS)	Ammonium persulfate, for molecular biology, for electrophoresis, $\geq 98$ %	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Aqua ad iniectabilia	Ampuwa Spüllösung Plastipur	Fresenius Kabi France, Sèvres, FR
Aqua destillata	Demi-Wasser	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, DE
Blotting Membran	Nitrocellulose Blotting-Membran (Porengröße 0,2 $\mu$ m)	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Bromphenolblau	Bromphenolblau Natriumsalz für die Elektrophorese, Farbstoff zur Laufmarkierung in der	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

Substanz	Produktbezeichnung	Produzent
	Gelelektrophorese. Indikator pH 3,0-4,6	
Butangas	Butan CV360	Camping Gaz (Deutschland) GmbH, Hungen-Inheiden, DE
Katalase Antikörper	Katalase mouse monoclonal antibody, TA502564	OriGene, Maryland, USA
CellWASH	BD CellWASH 349524	Becton Dickinson GmbH, BD Biosciences, Heidelberg, DE
CO <sub>2</sub> -Gas	Kohlendioxid UN 1013	Linde AG, Geschäftsbereich Linde Gas, Pullach im Isartal, DE
Desinfektionsmittel Wärme-Bad	Thermoklar	BIOMED Labordiagnostik GmbH, Oberschleissheim, DE
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1X), liquid (High Glucose), + 4,5 g/l Glucose	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
DMSO	Dimethylsulfoxid, plant cell culture tested	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), Modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate buffered salt solution (DPBS) with Calcium and Magnesium	Dulbecco's Phosphate buffered salt solution (DPBS), with calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Elektroden Lagerungslösung	storage solution for pH and ORP electrodes	Hanna Instruments Inc., Woonsocket, USA
Ethanol (70 %) zur Desinfektion	Technisolv Ethanol 70 % (v/v) denaturated Eurodenaturant	vwr International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, FR
FACS Clean Solution 5L 340345	BD FACS Clean Solution 340345	Becton Dickinson GmbH, BD Biosciences, Heidelberg, DE
FACSFlow	BD FACSFlow Sheath Fluid 342003	Becton Dickinson GmbH, BD Biosciences, Heidelberg, DE
FACSRinse	BD FACSRinse Solution 340346	Becton Dickinson GmbH, BD Biosciences, Heidelberg, DE
Fetales Rinderserum (FBS)	Sera Plus special processed FBS; sterile filtered	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Filterpapier 2,5 mm	Blotting Filter Papers, 2,5 mm thickness, 7.5 cm x 8.4 cm	Invitrogen, Carlsbad, USA
GAPDH-Antikörper	Anti-GAPDH hFAB Rhodamine Antibody	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Glutathionperoxidase Assay Kit	glutathione peroxidase assay kit, KA0882	Abnova, fisher scientific, part of Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Glycerol	Glycerin ROTIPURAN ≥ 99,5 %, p.a., wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Glycin	Glycin PUFFERAN ≥ 99 %, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Goat anti Mouse	Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP P0447	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK

Substanz	Produktbezeichnung	Produzent
Goat anti Rabbit	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP P0448	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
hLAP (TGF-beta 1) Antikörper	anti-human LAP (TGF-beta 1) APC-conjugated CatNo. FAB2463A	R&D Systems, Inc., a biotechnne brand, Minneapolis, USA
Isopropanol	2-Propanol GPR RECTAPUR	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol, for electrophoresis	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Methanol	Methanol Rotipuram $\geq 99,9\%$ , p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Milchpulver	Milchpulver, blotting grade, pulv., fettarm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Mn-SOD Antikörper	anti-SOD2 antibody (SPC-118) rabbit polyclonal	StressMarq Biosciences Inc., Victoria, Ca
NaCl	Natriumchlorid	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
Na-deoxycholat	Sodium deoxycholate, BioXtra, $\geq 98.0\%$ (dry matter, NT)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
NaF	Sodium fluoride, ACS reagent, $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
NFκB Antikörper	NFκB p50 (E-10) sc-8414	Santa Cruz Biotechne, California, USA
Nonidet P-40	Nonidet-P40 (NP40); Nonylphenylpolyethylene glycol; Polyethyleneglycol-p-isooctylphenyl ether; Octylphenoxy	United States Biological, Salem, USA
NOX4 Antikörper	pAb anti-Nox4 NB110-58849	Novus Biologicals, a biotechnne brand, Colorado, USA
Penicillin & Streptomycin Lösung	Penicillin-Streptomycin; 10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, sterile filtered, for cell culture	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
pH 10 Puffer	HI 7010 pH 10,01 buffer solution $\pm 0.01$ pH @ 25 °C / 77 °F	Hanna Instruments Inc., Woonsocket, USA
pH 4 Puffer / 7 Puffer	Pufferlösung pH 4,005 $\pm 0,02$ (25 °C) / pH 7,00 $\pm 0,02$ (20 °C) ROTI CALIPURE gebrauchsfertige Pufferlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ponceau S	Ponceau S, BioReagent, suitable for electrophoresis	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Complete Mini, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Protein Assay Kit	Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
SB-431542	4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]benzamide	Tocris, a biotechnne brand, Wiesbaden, DE
SDS	SDS $\geq 99,5\%$ , Blotting-Grade	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
SOD1 Antikörper	SOD1 antibody #2770	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
SOD1 Antikörper	anti-SOD1 antibody (SPC-116) rabbit polyclonal	StressMarq Biosciences Inc., Victoria, Ca

Substanz	Produktbezeichnung	Produzent
TEMED	TEMED 99 %, p.a., für die Elektrophorese	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
TGFβ1	Recombinant Human TGF-β1 (HEK293 derived)	PeptoTech Inc., Rocky Hill, USA
TGFβ RI/ALK-5 Antikörper	anti-mouse TGF-beta RI/ALK-5 APC-conjugated, CatNo. FAB5871A	R&D Systems, Inc., a biotechnne brand, Minneapolis, USA
TGFβ RII Antikörper	anti-human TGF-beta RII PE-conjugated, CatNo. FAB241P	R&D Systems, Inc., a biotechnne brand, Minneapolis, USA
TRIS	TRIS PUFFERAN, ≥ 99,3 %, Buffer Grade	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
TRIS Base	AnalaR NORMAPUR Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS, Trometamol)	vwr International GmbH, Darmstadt, DE
TRIS-HCl	TRIS-HCl 1 M Stock Solution	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Trypsin	Trypsin-EDTA 10X; sterile filtered	Biowest, Nuaille, FR
Tween	Tween 20 for molecular biology, viscous liquid	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Western Marker Antikörper	Roti-Mark WESTERN HRP-Konjugat, anti-WESTERN Marker Antikörper (Kaninchen)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Western Blot Gel Kit (12 %)	TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (12 %)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Western Blot Substrat	Immobilon Forte Western HRP Substrate	Millipore Corporation, Billerica, USA
Western Marker Proteinleiter	Roti-Mark WESTERN Marker	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

**Tabelle 5: Puffer**

Puffer	Zusammensetzung
Laemmli-Puffer 4x (Tris-Glycine SDS Sample Buffer)	0,3 g 250 mM Tris-HCl, pH 6,8 4 ml 40 % Glycerol 0,8 g 8 % SDS 0,01 g 0,1 % Bromphenolblau Auf 10 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen Vor Gebrauch 20 % Mercaptoethanol zusetzen
Laufpuffer / Elektrophoresenpuffer	80 ml 10 % Laufpuffer 10x Auf 800 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Laufpuffer / Elektrophoresenpuffer 10x	30,3 g 25 mM Tris, pH 8,3 - 8,8 144,2 g 192 mM Glycin 10 g 0,1 % SDS Auf 1000 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Nährmedium	DMEM 500 ml 50 ml 10 % FBS 5 ml 1 % HEPES 5 ml 1 % Penicillin-Streptomycin
RIPA+Complete	1 Tablette Complete Mini in 7 - 10 ml RIPA-Puffer nach Abcam lösen. Aliquots à 1ml bei -20 °C lagern
RIPA-Puffer nach Abcam	50 mM Tris (pH = 8) 150 mM NaCl 1 % NP-40 0,5 % Na-deoxycholat

Puffer	Zusammensetzung
	0,1 % SDS
TBS	100 ml 10 % TBS 10x Auf 1000 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
TBS 10x	12,1 g 7,7 mM Tris, pH 7,5 87,7g 150 mM NaCl Auf 1000 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
TBS-T	100 ml 10 % TBS 10x 1 ml 1 % Tween 20 Auf 1000 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Transfer (Blotting)-Puffer	40 ml Tris-Glycin Transferpuffer 25x 50 ml Methanol Auf 500 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Tris-Glycin Transferpuffer 25x	18,2 g 12 mM Tris-Base 90 g 96 mM Glycin Auf 500 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Trypsin	5 ml 10 % Trypsin-EDTA Auf 50 ml mit DPBS (without Calcium) auffüllen

## 2.3 Zellkultur

Die folgenden Methoden wurden, soweit erforderlich, unter sterilen Bedingungen und unter dem Abzug durchgeführt. Als Zellkulturmedium wurde *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 4,5 g Glucose unter Zusatz von 10 % fetalem Rinderserum (FBS), 1 % Penicillin und Streptomycin sowie 1 % HEPES verwendet. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und einer Sättigung von 5 % CO<sub>2</sub> in abgedeckten Petrischalen inkubiert. Das Medium wurde alle 2 – 3 Tage gewechselt und zu diesem Zweck abgesaugt, die Zellen mit *Phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen und neues Medium zu den Zellen gegeben. Sobald die Zellen zu 70 – 80 % konfluent waren, erfolgte der Zellzahl entsprechend das *Splitting* auf 3 - 5 Petrischalen: Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 5 ml 10 %-iges Trypsin-EDTA in PBS hinzugegeben. Die Fibroblasten wurden 5 - 10 min bei 37 °C inkubiert und hinsichtlich ihrer Ablösung kontrolliert. Daraufhin wurden die Zellen nach Stoppen der Reaktion mit Medium durch sanftes Auf- und Abpipettieren geerntet und in ein Falcon überführt. Die Fibroblasten wurden bei 300 g für 5 min abzentrifugiert, das überständige Medium abgesaugt und 3 - 5 ml frisches Medium mit dem Zellpellet vermischt. Die Zellsuspension wurde anschließend auf die Petrischalen verteilt und auf 13 ml Medium pro Petrischale aufgefüllt.

### 2.3.1 Einfrieren und Auftauen der Fibroblasten

Die Fibroblasten wurden in FBS + 10 % DMSO eingefroren. Hierfür wurden mind.  $1 \times 10^6$  Zellen in ein Kryoröhrchen mit 1 ml des FBS + 10 % DMSO überführt. Aufgrund der zellschädigenden Natur des DMSOs, das zur Verhinderung von Eiskristallbildung benötigt wird, wurde auf schnelles Arbeiten auf Eis geachtet. Die Kryoröhrchen mit den Fibroblasten wurden für mind. 24 h bei -80 °C in mit 100 % Isopropanol gefüllten Boxen gelagert und dann in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen der bei -80 °C in FBS + 10 % DMSO eingefrorenen Fibroblasten erfolgte in halbflüssigem Zustand durch Aufnahme von 1 ml frischen Medium und sanftes Auf- und Abpipettieren der Zellen.

Die so aufgenommenen Zellen wurden in eine mit 12 - 13 ml Zellkulturmedium gefüllten Petrischale gegeben. Nach 24 h erfolgte der Mediumwechsel.

### 2.3.2 Aussaat der Fibroblasten

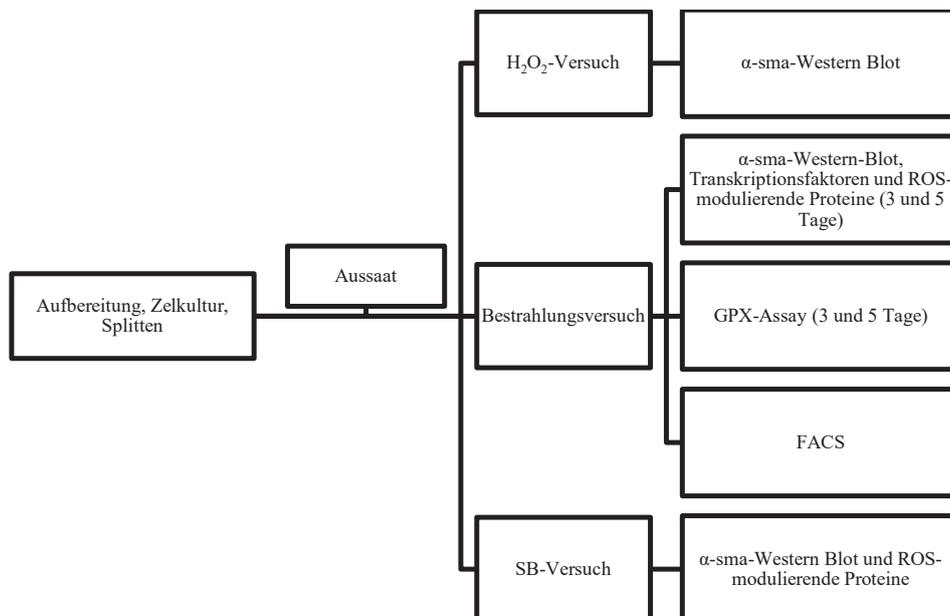
Die Fibroblasten wurden wie zuvor beschrieben mit Trypsin behandelt, jedoch wurde das Zellpellet in 5 - 10 ml Medium gelöst und von dieser Suspension 10 µl abgenommen, die in eine Neubauer Zählkammer gegeben wurden. Von der Zellsuspension wurde ein nach folgender Formel berechneter Anteil zu der geforderten Gesamtmenge Medium gegeben.

$$\frac{Z_0}{Z_w} = \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\frac{G}{\text{Verdünnungsfaktor}} = M_1$$

G = Gesamtmenge der gewünschten Zellsuspension für den Versuchsansatz; M1 = Menge in ml der geernteten Zellen mit der Zellkonzentration Z0, die der gewünschten Gesamtmenge an Zellsuspension G zugegeben werden muss, damit G eine Zellkonzentration von Zw aufweist; Z0 = gezählte Zellzahl x 10<sup>4</sup> = tatsächliche Zellkonzentration/ml; Zw = gewünschte Zellkonzentration/ml

Zielkonzentration für die 6-Well Platten betrug 3 x 10<sup>4</sup> Zellen und für die 12-Well Platten 1,1 x 10<sup>4</sup> Zellen/Well. In jedes Well wurden 1 ml der Zellsuspension gegeben sowie 1 ml frisches Medium ergänzt, sodass die Zellen über Nacht adhärent werden konnten. In Abb. 1 sind die Versuchsabläufe grafisch dargestellt.



**Abb. 1: Schema der Versuchsdurchführung** Zur Darstellung der Verfahrensweise mit den Zellen nach Aussaat.

## 2.4 Inkubation der Fibroblasten mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

MD-Fibroblasten wurden zu  $5 \times 10^4$  Zellen/6-Well ausgesät. Die Zellen wurden mit 0; 1; 5 oder 10 ng/ml TGF $\beta$  und in Kombination mit 0; 10; 20; 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt (Abb. 2). Über die Versuchsdauer (5 Tage) erfolgte ein täglicher Wechsel der Medien. Dieser Versuch wurde freundlicherweise durch die MTA Christa Wilkens durchgeführt.

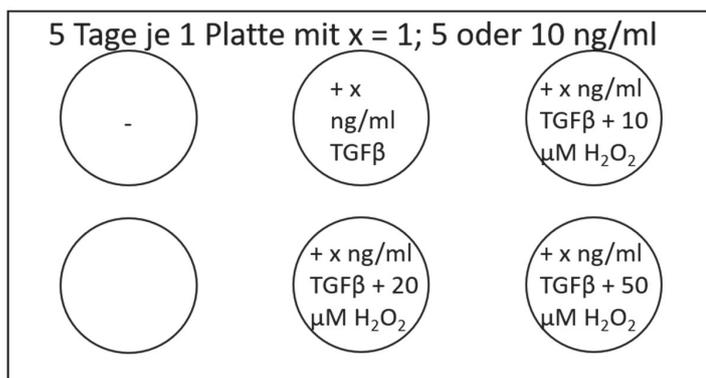


Abb. 2: Schematische Darstellung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung

## 2.5 Bestrahlung der Fibroblasten mit blauem Licht ( $\lambda = 453$ nm)

Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 3 und 5 Tagen täglich bestrahlt oder unbestrahlt belassen. Während der Bestrahlung wurden die Kontroll- und behandelten Fibroblasten mit 1 ml PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (PAN-Biotech) bedeckt. Die Bestrahlung erfolgte mit einer 453 nm emittierenden LED-Lampe (Prototyp, Phillips) mit einer Wirkleistung von 38 mW/cm<sup>2</sup> und 40 J/cm<sup>2</sup>, einer nicht-toxischen Strahlendosis entsprechend (Krassovka et al., 2019). Die Kontrollfibroblasten wurden währenddessen bei 25 °C in einem *Biometra OV3 Hybridisation Oven* gelagert. Nach der Behandlung wurden die Kontroll- und bestrahlten Fibroblasten mit 1,5 ml unbehandeltem Medium oder mit 1,5 ml Medium + 1 ng/ml TGF $\beta$  inkubiert (Abb. 3).

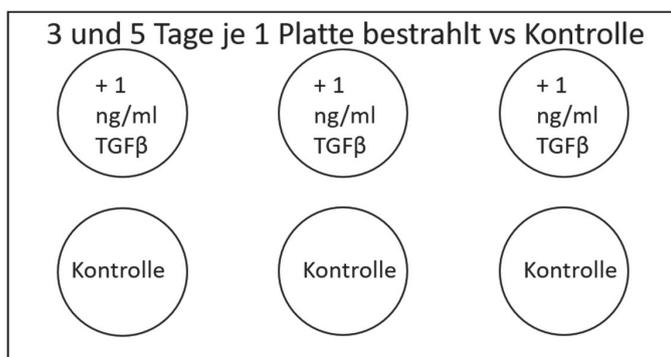


Abb. 3: Exemplarische Darstellung der Bestrahlungsexperimente

## 2.6 GPX-Assay

Die Bestimmung der GPX-Aktivität erfolgte nach Anleitung des *Glutathione Peroxidase Assay Kits* (Abnova) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben bestrahlt und anschließend ohne RIPA eingefroren. Es wurden 100 µl PBS zu den gefrorenen Zellen gegeben. Es folgte eine Homogenisierung durch die Sonicatorsonde eines Ultraschallprozessors durch 10 Impulse (80 % Amplitude, Cycle 0,5 sek) und Zentrifugation für 15 min bei 4 °C mit 10000 g. Der Überstand wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert. Von diesem Überstand wurden je 25- bzw. 12,5 µl in eine 96-Well-Platte gegeben und auf 50 µl mit Assay-Puffer aufgefüllt. Der NADPH-Standard wurde aus 25 µl der im Kit enthaltenen 40 mM NADPH-Lösung und 975 µl H<sub>2</sub>O hergestellt. Der entstandene 1 mM NADPH-Standard wurde in Doppelbestimmung jeweils zu 0-, 20-, 40-, 60-, 80-, 100 µl pipettiert und mit Assay-Puffer auf 100 µl aufgefüllt. Als Positivkontrolle dienten 5 - 10 µl GPX in Doppelbestimmung, welche auf 50 µl aufgefüllt wurden. Der Reaktionsmix setzte sich aus 33 µl Assay-Puffer, 3 µl NADPH-Lösung (40 mM), 2 µl Glutathionreduktase-Lösung sowie 2 µl Glutathion-Lösung zusammen. Je 40 µl des Reaktionsgemisches wurden zu dem Überstand + Assay-Puffer und der Positivkontrolle hinzugegeben. Um den Anteil des vorhandenen Glutathiondisulfides zu entfernen, wurde die Lösung 15 min inkubiert. Zum Starten der GPX-Reaktion wurden 10 µl Cumolhydroperoxid-Lösung zu den Proben und der Positivkontrolle hinzugegeben, die Absorption bei  $\lambda = 340$  nm wurde nach 0 und 5 min gemessen. Die Inkubation zwischen diesen Messzeitpunkten verlief lichtgeschützt bei 25 °C. Die Messung der GPX-Aktivität erfolgt über den Verbrauch von NADPH, welches eine Absorption von  $\lambda = 340$  nm aufweist. Der Mittelwert des Blanks (0 µl NADPH) wurde von dem jeweiligen Mittelwert des NADPH-Standards subtrahiert, sodass aus den Ergebnissen eine Standardkurve errechnet werden konnte. In die lineare Regressionsgerade wurde, nach Umstellung nach x, die gemessene Absorption zum Zeitpunkt 0 beziehungsweise 5 min gegeben. Die Ergebnisse wurden subtrahiert (Absorption 0 min – Absorption 5 min) und die errechnete Differenz B in die folgende Gleichung eingesetzt:

$$\left( \frac{B}{5 \text{ min} * \text{volum} \text{ sample } V} \right) * \text{sample dilution} = \text{GPX-Aktivität in nmol/min/ml} = \text{mU/ml}$$

Mit  $V = 0,025$  oder  $0,0125$  ml und *sample dilution* 2 oder 4.

## 2.7 Durchflusszytometrische Bestimmung der Proteinexpression

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse fluoreszenzmarkierter Zellen. Durch Bindung fluorochrom gebundener Antikörper an Oberflächenantigene und Messen des emittierten Lichtes können Zellen effektiv charakterisiert werden. Die Fibroblasten wurden, wie zuvor beschrieben, nach dem Ende der Bestrahlung mittels Trypsin-EDTA abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen für mind. 15 min bei 4 °C in Eiswasser gekühlt, danach mit 300 g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden mit FACS-Puffer

25

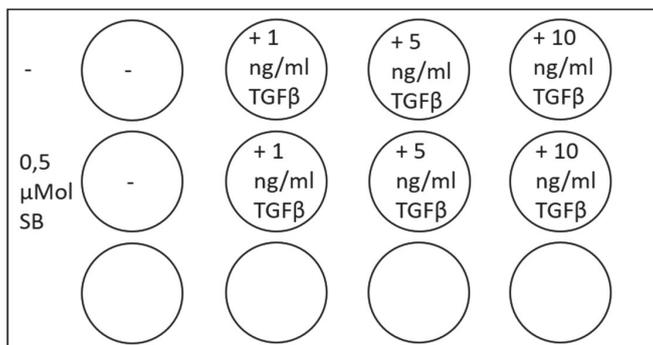
(Cellwash mit 3 % FBS) versetzt, gewaschen und wieder abzentrifugiert. Danach erfolgte mit 50 µl FBS für 5 min eine Absättigung der Bindestellen zur Verhinderung unspezifischer Bindung des Antikörpers. Anschließend wurden 5 µl des jeweiligen Antikörpers (ALK 3, 5, 7, TGF-Rezeptor II und hLAP-TGF, s. Tab. 5) auf die Zellen gegeben und für 30 min im Dunkeln auf Eiswasser inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 200 - 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und analysiert. Bei der Analyse mit BD CellQuest Pro Software wurden die Kontrollfibroblasten ohne Antikörperzugabe so justiert, dass max. 2 % positiv waren.

**Tabelle 6: FACS Antikörper**

Antikörper	Hersteller	Katalognummer	Konzentration	Applikation
anti-human LAP (TGFβ1) APC-conjugated	R&D Systems, a biotechnie brand	FAB2463A	10 % (5 µl auf 50 µl)	Alleine
anti-hBMPRIA/ALK3 PE-conjugated	R&D Systems, a biotechnie brand	FAB346P	10 % (5 µl auf 50 µl)	Mit ALK7-AK
anti-human ALK-7 APC-conjugated	R&D Systems, a biotechnie brand	FAB77491A	10 % (5 µl auf 50 µl)	Mit ALK3-AK
anti-human TGFβ RII PE-conjugated	R&D Systems, a biotechnie brand	FAB241P	10 % (5 µl auf 50 µl)	Mit ALK5-AK
anti-mouse TGFβ RI/ALK-5 APC-conjugated	R&D Systems, a biotechnie brand	FAB5871A	10 % (5 µl auf 50 µl)	Mit TGF RII-AK

## 2.8 Die Behandlung der Fibroblasten mit dem Inhibitor SB-431542

Die Fibroblasten wurden unter täglichem Wechsel des Mediums 5 Tage behandelt. Auf die Kontrollzellen wurde 1 ml unbehandeltes Medium, auf die zu behandelnden Fibroblasten 1 ml Medium mit 0,5 µmol SB-431542, einem ALK-Rezeptor 4,5 und 7 Inhibitor (Laping et al., 2002, Seßler, 2017), gegeben. Sowohl die Zellen mit als auch ohne SB-Zusatz wurden nun jeweils mit 0; 1; 5 oder 10 ng/ml TGFβ inkubiert (Abb. 4). Mittels Western Blot-Analyse wurde die Expression von α-sma, Katalase, Nox4 und Mn-SOD analysiert.



**Abb. 4: Grafische Darstellung der Behandlung mit SB-431542**

## 2.9 Proteinernte für die Western Blot-Analyse

Für die Proteinernte wurden die Fibroblasten nach Bestrahlung oder SB-Behandlung mit Trypsin-EDTA abgelöst und für 5 min mit mindestens 10000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS gelöst und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, welches daraufhin bei mindestens 10000 g abzentrifugiert, abgesaugt und mit 20 - 40 µl RIPA-Puffer gefüllt wurde. Die für das GPX-Assay vorgesehenen Proteine erhielten keinen RIPA-Puffer. Die Proteine wurden bei -80 °C eingefroren.

## 2.10 Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot-Analyse

### 2.10.1 BCA-Proteinassay

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Anleitung des Pierce *BCA Protein Assay Kit* von ThermoFisher. Die in RIPA gelösten Zellen wurden durch die Sonicatorsonde eines Ultraschallprozessors durch 10 Impulse (80 % Amplitude, Cycle 0,5 sek) lysiert („sonifiziert“). 4 µl der sonifizierten Fibroblasten wurden mit 20 µl PBS vermischt. Je 10 µl dieser Lösung wurden in Doppelbestimmung untersucht. Der zugehörige BSA-Standard wurde nach Tab. 6 pipettiert. Pro Well wurden 200 µl BCA-Working Reagenz hinzugefügt und die 96-Well-Platte mit einer Folie versiegelt. Das Working Reagenz wurde nach Anleitung aus einem Teil Reagenz B und 50 Teilen Reagenz A aus dem Kit zusammengesetzt. Die Proben inkubierten 30 min bei 37 °C. Die Analyse erfolgte anschließend mittels eines Plattenphotometers (*Victor multilabel plate readers*). Das Assay macht sich zu Nutze, dass  $\text{Cu}^{2+}$  von Peptidbindungen gebunden und in alkalischem Milieu zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert wird, welches mit *bichinchoninic acid* (BCA) reagiert, wodurch es zu einem Farbumschlag kommt. Dieser kann in einem Absorptionsbereich von  $\lambda = 540 - 590 \text{ nm}$  detektiert werden. Diese Methode der Proteinbestimmung zeigt im Gegensatz zur Lowry-Methode eine geringere Interferenz mit Salzen und Tensiden (Smith et al., 1985).

**Tabelle 7: BSA-Standard**

Konzentration [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	Bezeichnung	Albumin Standard 2 mg/ml [ $\mu\text{l}$ ]	PBS [ $\mu\text{l}$ ]
2	A	300	0
1,5	B	375	125
1	C	325	325
0,75	D	175 von B	175
0,5	E	325 von C	325
0,25	F	325 von E	325
0,125	G	325 von F	325
0,025	H	100 von G	400
0 = BLANK	I	0	400

### 2.10.2 Western Blot-Analyse

Der Western Blot dient der Analyse der Proteinexpression. Die Proteine werden nach ihrer Größe aufgetrennt und nachfolgend auf eine Membran übertragen, sodass die Detektion mittels

antigenspezifischer Antikörper möglich wird. Auf diese Weise konnten einzelne Proteine nachgewiesen und qualitativ und quantitativ miteinander verglichen werden.

12 %-ige FastCast stainfree Gele von BioRad wurden der Anleitung des Herstellers folgend hergestellt. Für das Trenngel wurden 3 ml Resolver A, 3 ml Resolver B, 30 µl APS (10 %) und 3 µl TEMED benötigt. Die Polymerisation fand mind. 15 min bedeckt von 70 %-igem Ethanol statt. Nach Abgießen des Ethanols wurde das Gel mit Sammelgel, gemischt aus 1 ml Stacker A, 1 ml Stacker B, 10 µl APS (10 %) und 2 µl TEMED, aufgefüllt. Das Gel mit eingesetztem 10-Probenkamm ruhte 15 - 25 min und wurde danach in mit destilliertem Wasser (aqua dest) getränkten Zellstoff bis zur Benutzung bei 4 °C aufbewahrt. Die Gele wurden in die Gelkammern eingespannt und diese mit Laufpuffer, bestehend aus 10 %-igem Laufpuffer (10x) und aqua dest, gefüllt. 10 oder 20 µg Protein wurden aus den Zellproben abgenommen und mit aqua dest auf mind. 12 µl aufgefüllt. Erfolgte die Durchführung des Western Blots nicht am gleichen Tag, wurden die so vorbereiteten Proteine für max. 2 - 3 Tage bei -20 °C eingefroren. 5 µl Laemmli-Puffer aus 80 % Laemmli und 20 % Mercaptoethanol wurden zu den Proteinproben zugegeben, welche 5 min bei mindestens 10000 g zentrifugiert und anschließend 5 min bei 95 °C erhitzt wurden, um danach in die Probentaschen des Gels gegeben zu werden. Das β-Mercaptoethanol reduziert die Disulfidbrücken der Proteine, wodurch die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine aufgelöst wird. 5 µl Roti Western Marker in einer separaten Tasche des Gels dienen der kDa-Bestimmung. 20 min wurde eine Spannung von 60 Volt angelegt, sodass die Proteine an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel aufgereiht wurden. Danach wurde die Spannung für 40 - 45 min auf 120 - 130 Volt erhöht.

Die Proteine komplexieren mit im Gel enthaltenem SDS und erhalten eine negative Ladung, sodass sie nun als gestreckte Polypeptidketten durch Sammel- und Trenngel in Richtung der basalen Anode wandern können. Das Sammelgel ist hierbei grobporiger und weist einen niedrigeren pH auf. Trenn- und Sammelgel enthalten Cl<sup>-</sup>-Ionen, während sich im Laufpuffer Glycin befindet, welches im niedrigen pH des Sammelgels vermehrt in der ungeladenen Form vorliegt. Wird nun eine Spannung angeschlossen, wandern die Cl<sup>-</sup>-Ionen am schnellsten und die Glycine am langsamsten, sodass die Proteinfraction zwischen beiden eingeschlossen wird. An der Grenze von Trenn- und Sammelgel treffen die SDS-Proteinkomplexe auf die Chloridionenfront und werden verlangsamt, die Proteine reihen sich an dieser Grenze auf. Im Trenngel läuft das Glycin indes schneller als die Proteine, da es in dem höheren pH vermehrt negativ geladen vorliegt. In dem Trenngel kann so eine Auftrennung nach Größe erfolgen, da große Proteine langsamer durch das Gel laufen als kleine (Laemmli, 1970, Hachmann und Amshey, 2005). Das Gel wurde anschließend im ChemiDoc Imager 45 sek aktiviert (Activation 45 sek, rapid auto exposure) und ein Foto für die anschließende Normierung auf Totalprotein angefertigt. Der Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte im Trans-Blot Turbo Transfer System mit ausreichend Transferpuffer aus 10 % Methanol, 8 % Transferpuffer und 82 % destilliertem Wasser, in welchem die Membran sowie Filterpapier vorher eingeweicht wurden.

Der erfolgreiche Transfer wurde mit dem BioRad ChemiDoc Imaging System kontrolliert, danach wurden ungesättigte Bindungsstellen mittels 5 % Milchpulver in TBS-T oder 5 % BSA in TBS-T für 1 h bei RT abgesättigt. Die Membranen wurden wie in Tab. 7 über Nacht mit den Primärantikörpern bei 4 °C inkubiert. Die Sekundärantikörper wurden anschließend für 1 h bei RT hinzugegeben (Tab. 8). Vor und nach Zugabe des Sekundärantikörpers wurde die Membran 3 x 5 min mit TBS-T und vor Aufnahme des Fluoreszenzbildes zusätzlich mind. 5 min in TBS gewaschen.

**Tabelle 8: Western Blot Antikörper**

Anti-körper	Hersteller	Katalog-nummer	Spezies	Größe [kDa]	Block	Konzentration	Applikation
$\alpha$ -smooth muscle actin	Abcam	Ab7817	Mouse	40	5 % BSA	1:1000 in 5 % BSA	Als 2., mit $\beta$ -Catenin und Katalase auf 10 $\mu$ g Blot Tag 3/5; Mit Mn-SOD, Katalase (und NOX) auf SB-Blot
$\beta$ -Catenin	Abcam	Ab16051	Rabbit	94	5 % BSA	1:3000 in 5 % BSA	Als 2., mit $\alpha$ -sma und Katalase auf 10 $\mu$ g Blot Tag 3/5
Mn-SOD	StressMarq Biosciences	SPC-118C/D	Rabbit	25	5 % BSA	1:4000 in 5 % BSA	Als 2., mit NOX auf 20 $\mu$ g Blot Tag 3/5; Mit Katalase, $\alpha$ -sma (und NOX) auf SB-Blot
Katalase	Origene	TA502564	Mouse	57	5 % BSA	1:3000 in 5 % BSA	Als 2., mit $\beta$ -Catenin und $\alpha$ -sma auf 10 $\mu$ g Blot Tag 3/5; Mit Mn-SOD, $\alpha$ -sma (und NOX) auf SB-Blot
SOD1	Cell Signaling Technology	2770	Rabbit	18	5 % BSA	1:1000 in 5 % BSA	Alleine, als 1. auf 10 $\mu$ g Blot Tag 3/5
SOD1	StressMarq Biosciences	SPC-116-D	Rabbit	23	5 % BSA	1:1000 in 5 % BSA	Alleine, als 1. auf 10 $\mu$ g Blot Tag 3/5
NF $\kappa$ B	Santa Cruz Biotechnology	Sc-8414	Mouse	50/105	5 % Milch	1:500 in 5 % Milch	Alleine, als 1. auf 20 $\mu$ g Blot Tag 3/5
NOX4	Novus – a biotechnie brand	NB110-58849	Rabbit	67	5 % BSA	1:1000 in 5 % BSA	Als 2., mit Mn-SOD auf 20 $\mu$ g Blot Tag 3/5; Alleine oder mit

Anti-körper	Hersteller	Katalognummer	Spezies	Größe [kDa]	Block	Konzentration	Applikation
							Katalase, Mn-SOD und $\alpha$ -sma auf SB-Blot

**Tabelle 9: Sekundärantikörper und Proteinmarker**

Name	Hersteller	Katalognummer	Konzentration	Applikation
Polyclonal Goat anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	Dako	P0447	0,1 %	mit 0,025 % anti-Western Marker in TBS-T
Polyclonal Goat anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako	P0448	0,1 %	mit 0,025 % anti-Western Marker in TBS-T
Roti-Mark WESTERN Marker	Roth	0948.1	5 $\mu$ l	In 1. Tasche des Western Blot Gels

Die Auswertung der Proteinexpression erfolgte mit Image Lab Version 6.0.1 build 34, 2017, Standard Edition, Bio-Rad Laboratories. Die Normierung auf das Totalprotein der Kontrolle wurde in der Regel gegenüber der auf das *housekeeping protein* bevorzugt; dies begründet sich auf der in eigenen Untersuchungen verbesserten Stabilität und Unabhängigkeit des Totalproteins, dies konnte auch in anderen Arbeiten gezeigt werden (Gilda und Gomes, 2013) (s. „Anhang I: Methodische Vorversuche zur Ladekontrolle“). Lediglich der Versuch bezüglich der Beeinflussung der  $\alpha$ -sma-Expression durch  $H_2O_2$  wurde auf GAPDH normiert. GAPDH wurde für 1 h bei RT im Dunkeln in 1:5000 Verdünnung in 3% BSA in TBS-T inkubiert. Zur Background-Subtraktion wurde die rolling ball Methode mit einer disc size = 100 mm genutzt.

## 2.11 Statistische Auswertung

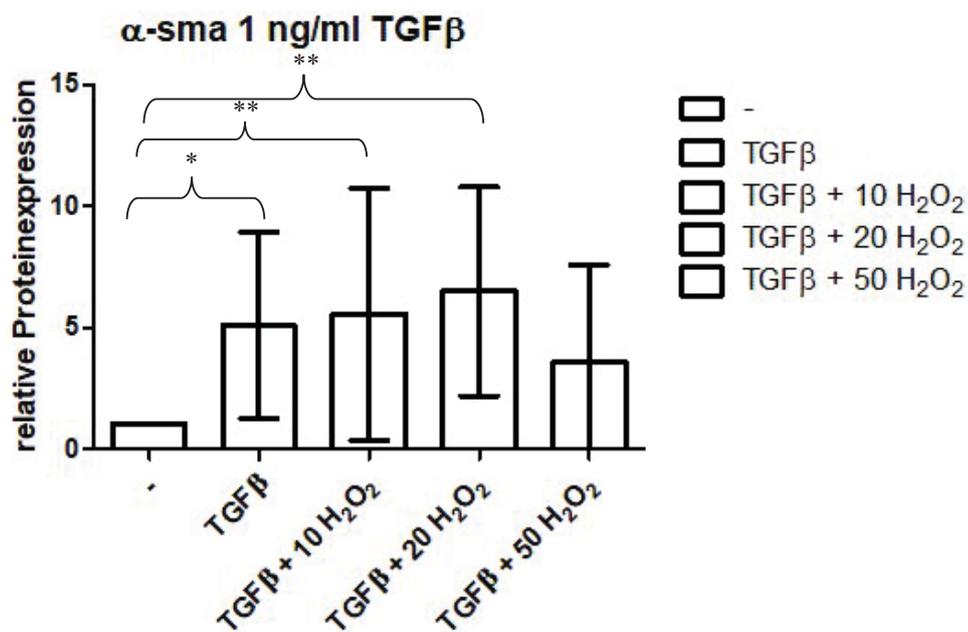
Es wurde mit Excel für Office 365 Microsoft Office 16.0.11231.20122 64 Bit und für die statistischen Tests und grafischen Auswertungen mit GraphPad Prism Version 5.01, 2007 für Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com), gearbeitet. Die Rohwerte wurden für die Analyse auf die CTS oder MD-Kontrolle oder die TGF $\beta$ - bzw.  $H_2O_2$ -unbehandelten Fibroblasten normiert. Eine Analyse der Gaußschen Normalverteilung erfolgte mittels Kolmogorov-Smirnov Test mit Dallal-Wilkinson-Lillie für den p-Wert. Bei Normalverteilung wurde zum Vergleich innerhalb einer Gruppe (z. B. CTS) ein repeated measures one-way-ANOVA angewandt, während in sonstigen Fällen der Friedmann-Test zur Untersuchung genutzt wurde. Um CTS und MD oder SB-behandelt und -unbehandelt untereinander zu vergleichen, wurden die entsprechenden Rohwerte auf die korrespondierende (auf dem gleichen Western Blot befindliche oder im FACS durchgeführte) Kontrolle normiert und two-way-ANOVA zwecks Analyse angewendet. Als Post-hoc Test wurden bei Normalverteilung Bonferroni's und anderweitig Dunn's multiple comparison test verwendet.

### 3 Ergebnisse

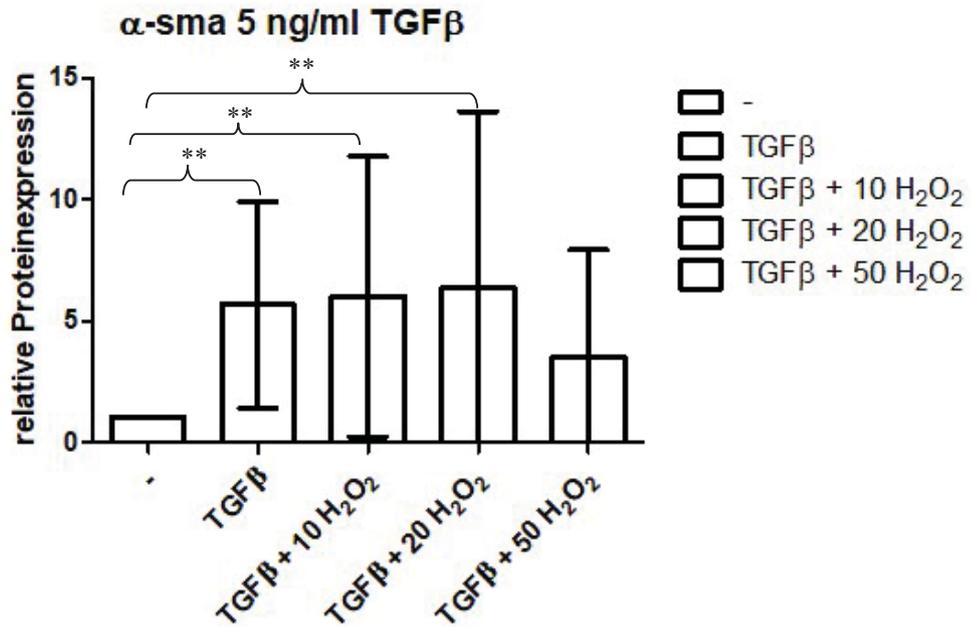
Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall. In der grafischen Darstellung von Signifikanz stellt \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,005$  dar. Originaldaten und zusätzliche Auswertungen sind in „Anhang III: Ergebnisse – Daten und grafische Darstellung“ und „Anhang IV: Rohwerte“ hinterlegt.

#### 3.1 Der Effekt von $H_2O_2$ auf die $\alpha$ -sma-Expression

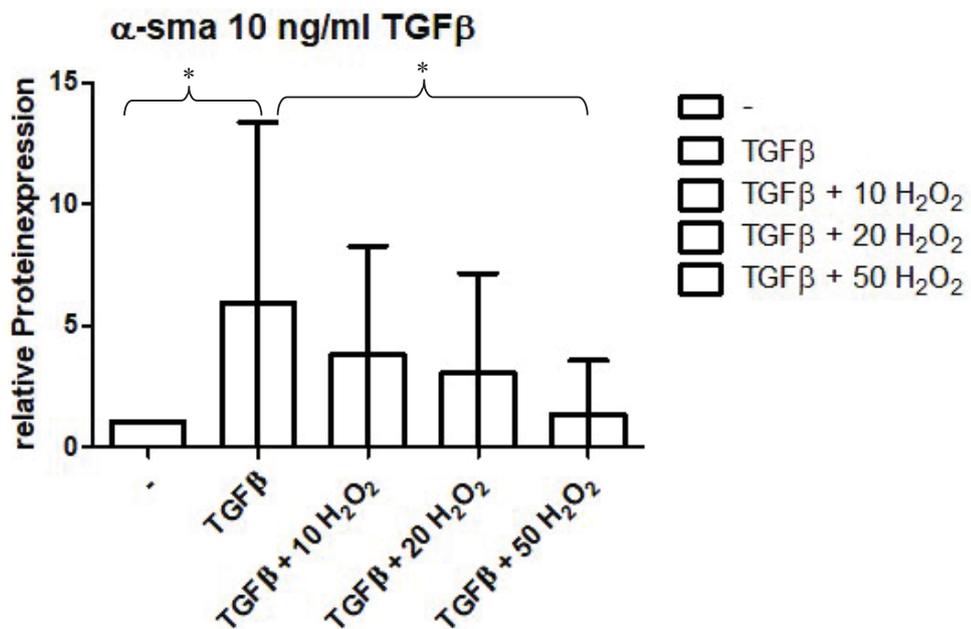
Nach Aktivierung mit verschiedenen Konzentrationen von TGF $\beta$ 1 wurden die MD-Fibroblasten mit ansteigenden Konzentrationen von  $H_2O_2$  behandelt, um zu untersuchen, ob eine Zugabe von ROS die  $\alpha$ -sma-Expression modulieren könnte.



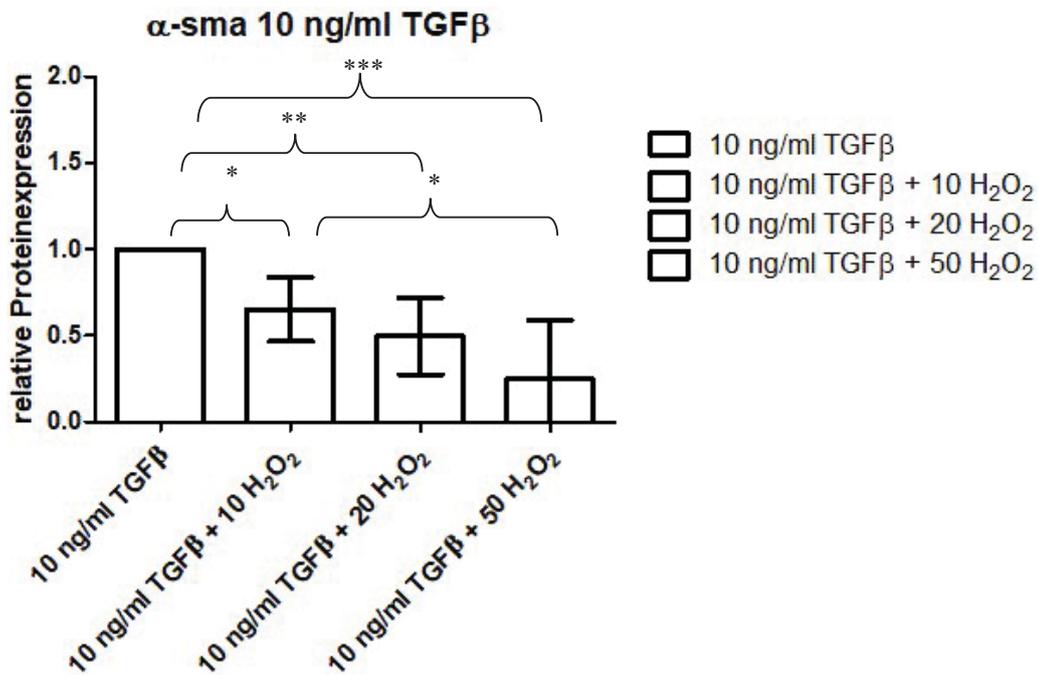
**Abb. 5:  $\alpha$ -sma-Expression in MD, Behandlung mit  $H_2O_2$  + TGF $\beta$  1 ng/ml, (n = 3)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf Kontrolle. MD-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 0; 10; 20; 50  $\mu$ M  $H_2O_2$  behandelt und mit TGF $\beta$  1 ng/ml aktiviert (bis auf eine Kontrolle ohne TGF $\beta$ / $H_2O_2$ ). Signifikanz \* =  $p < 0,05$  (- vs TGF $\beta$ ), \*\* =  $p < 0,01$  (- vs TGF $\beta$  + 10  $H_2O_2$ , - vs TGF $\beta$  + 20  $H_2O_2$ ) und \*\*\* =  $p < 0,005$ .



**Abb. 6:  $\alpha$ -sma-Expression in MD, Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + TGF $\beta$  5 ng/ml, (n = 3)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf Kontrolle. MD-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 0; 10; 20; 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt und mit TGF $\beta$  5 ng/ml aktiviert (bis auf eine Kontrolle ohne TGF $\beta$ /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 (- vs TGF $\beta$ , - vs TGF $\beta$  + 10 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, - vs TGF $\beta$  + 20 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und \*\*\* = p < 0,005.



**Abb. 7:  $\alpha$ -sma-Expression in MD, Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + TGF $\beta$  10 ng/ml, (n = 3)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf Kontrolle. MD-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 0; 10; 20; 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt und mit TGF $\beta$  10 ng/ml aktiviert (bis auf eine Kontrolle ohne TGF $\beta$ /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Signifikanz \* = p < 0,05 (- vs TGF $\beta$ , TGF $\beta$  vs TGF $\beta$  + 50 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), \*\* = p < 0,01 und \*\*\* = p < 0,005.



**Abb. 8:  $\alpha$ -sma-Expression in MD, Behandlung mit H $_2$ O $_2$  + TGF $\beta$  10 ng/ml, normiert auf TGF $\beta$ -Gruppe, (n = 3)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf 10 ng/ml TGF $\beta$ . MD-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 0; 10; 20; 50  $\mu$ M H $_2$ O $_2$  behandelt und mit TGF $\beta$  10 ng/ml aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05 (TGF $\beta$  vs TGF $\beta$  + 10 H $_2$ O $_2$ , TGF $\beta$  + 10 H $_2$ O $_2$  vs TGF $\beta$  + 50 H $_2$ O $_2$ ), \*\* = p < 0,01 (TGF $\beta$  vs TGF $\beta$  + 20 H $_2$ O $_2$ ) und \*\*\* = p < 0,005 (TGF $\beta$  vs TGF $\beta$  + 50 H $_2$ O $_2$ ).

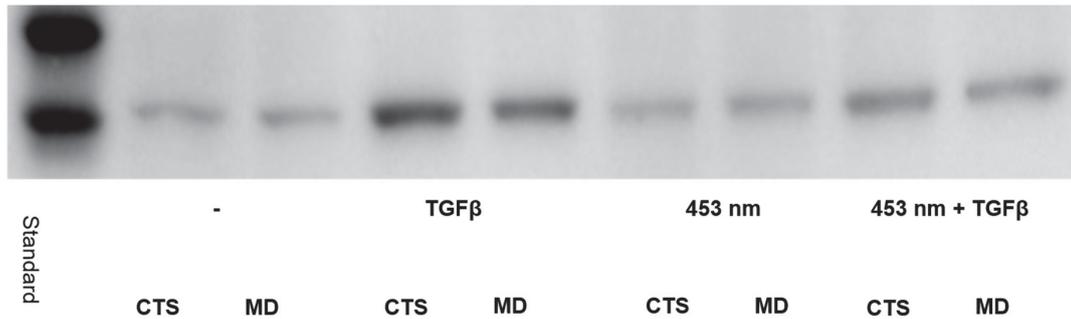
Durch Zugabe von 1 oder 5 ng/ml TGF $\beta$ 1 stieg die  $\alpha$ -sma-Expression auf das 5 - 6fache an. Bei Behandlung mit 0; 10; 20  $\mu$ M H $_2$ O $_2$  wurde diese Veränderung der  $\alpha$ -sma-Expression nicht signifikant beeinflusst. Bei der Behandlung mit 50  $\mu$ M H $_2$ O $_2$  blieb die Induktion der  $\alpha$ -sma-Expression aus (Abb. 5 + 6). Mit 10 ng/ml TGF $\beta$ 1 behandelte MD-Fibroblasten zeigten lediglich eine  $\alpha$ -sma-Induktion in H $_2$ O $_2$  unbehandelten, aber TGF $\beta$  behandelten Zellen. Mit TGF $\beta$ 1 und 50  $\mu$ M H $_2$ O $_2$  behandelte Zellen exprimierten signifikant weniger  $\alpha$ -sma als mit TGF $\beta$ 1 behandelte (Abb. 7). Normiert man auf die Positivkontrolle, mit 10 ng/ml TGF $\beta$ 1 behandelten Fibroblasten ohne H $_2$ O $_2$ -Behandlung (Abb. 8), erkennt man eine signifikante Hemmung der TGF $\beta$ 1 induzierten  $\alpha$ -sma-Expression durch H $_2$ O $_2$ . Die  $\alpha$ -sma-Reduktion, verglichen mit der mit TGF $\beta$ 1 behandelten Kontrollgruppe, beträgt maximal ca. 75 % bei den mit 50  $\mu$ M H $_2$ O $_2$  behandelten Zellen.

### 3.2 Evaluation der Proteinexpression von ROS-modulierenden Enzymen und Transkriptionsfaktoren

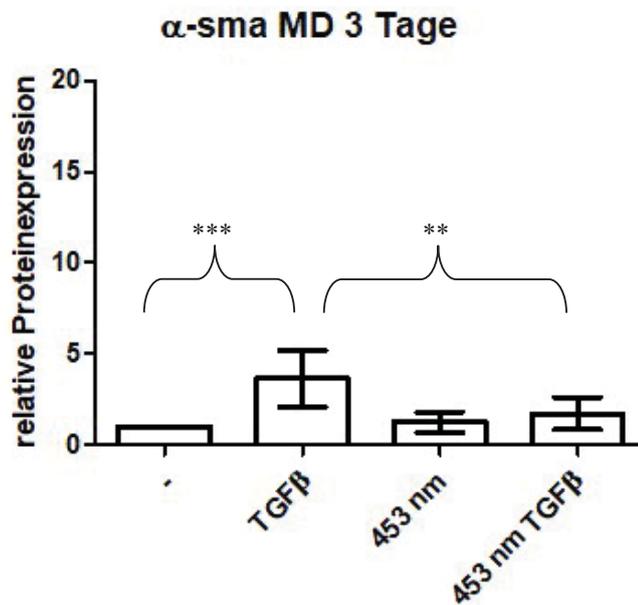
Die Fibroblasten wurden über eine Dauer von 3 oder 5 Tagen täglich wie zuvor beschrieben bestrahlt. Es wurden CTS- und MD-Fibroblasten mit- und untereinander verglichen. Die Analyse diente der Untersuchung möglicher Quellen und Einflussfaktoren auf ROS.

### 3.2.1 Beeinflussung der $\alpha$ -sma-Expression durch Bestrahlung mit blauem Licht

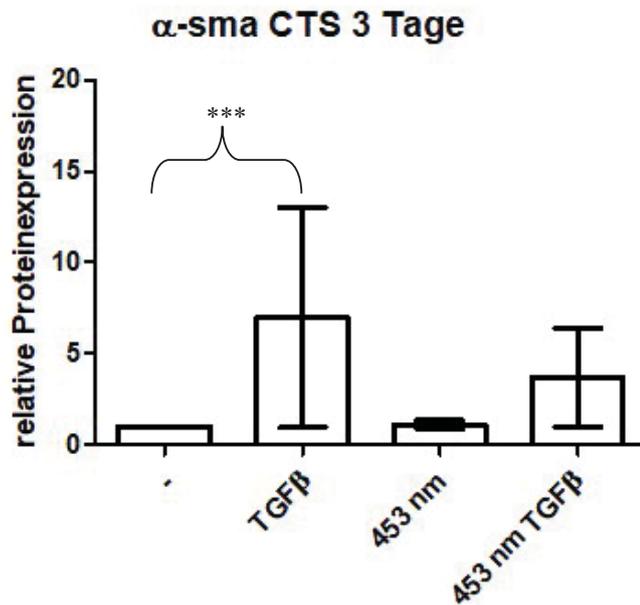
Es zeigen sowohl MD- und CTS-Zellen durch TGF $\beta$ 1-Behandlung nach 3 und 5 Tagen eine signifikante Zunahme der  $\alpha$ -sma-Expression (Abb. 10, 11, 13, 14). TGF $\beta$ 1-aktivierte MD-Zellen zeigen nach 3 Tagen zusätzlicher Bestrahlung mit 453 nm eine signifikante Reduktion der  $\alpha$ -sma-Expression auf weniger als die Hälfte ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zu den TGF $\beta$ 1-behandelten Zellen (Abb. 10).



**Abb. 9:**  $\alpha$ -sma 3 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot mit (von links nach rechts) Standard, CTS-, MD-, CTS TGF $\beta$ , MD TGF $\beta$ , CTS 453 nm, MD 453 nm, CTS TGF $\beta$  + 453 nm, MD TGF $\beta$  + 453 nm

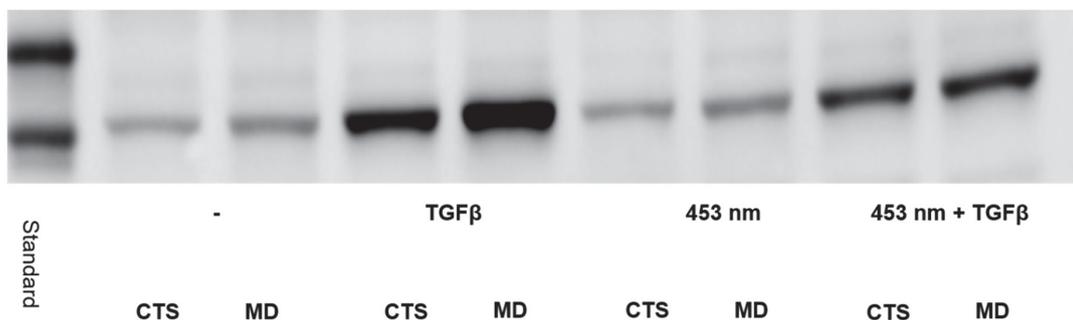


**Abb. 10:**  $\alpha$ -sma 3 Tage MD, (n = 8) Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. MD-Fibroblasten wurden 3 Tage mit 40 J/cm $^2$  (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGF $\beta$  aktiviert. Signifikanz \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  (TGF $\beta$  vs 453 nm + TGF $\beta$ ) und \*\*\* =  $p < 0,005$  (- vs TGF $\beta$ ).

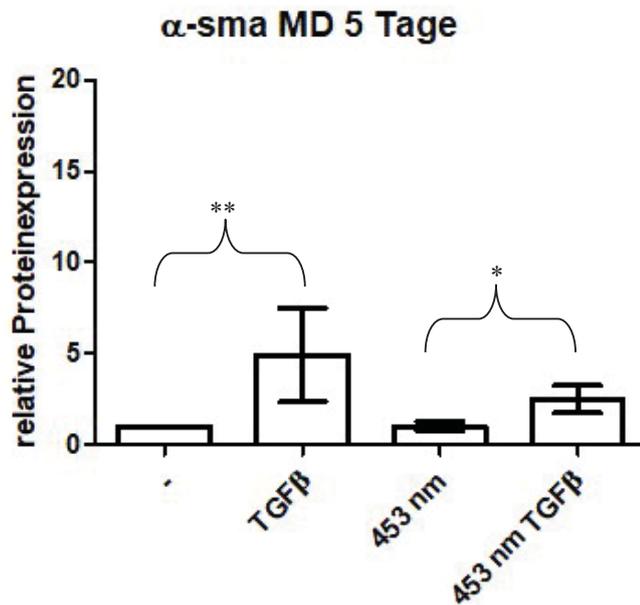


**Abb. 11: α-sma 3 Tage CTS, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. CTS-Fibroblasten wurden 3 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 und \*\*\* = p < 0,005 (- vs TGFβ).

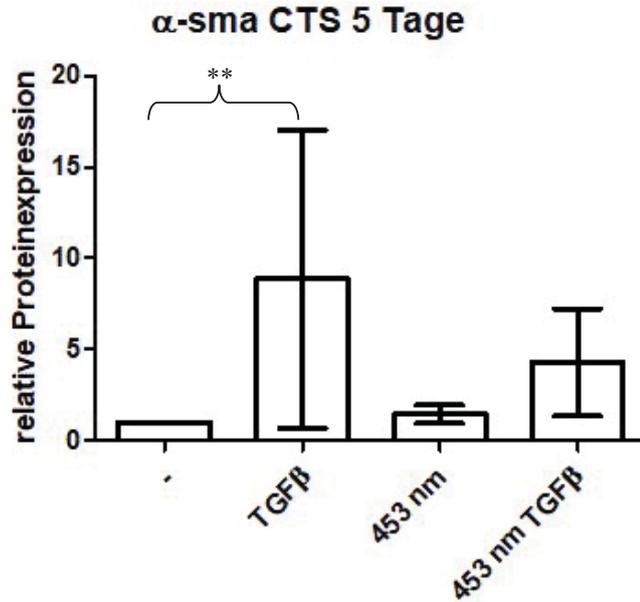
Werden mit TGFβ1-aktivierte MD-Fibroblasten mit 453 nm bestrahlt, halbiert sich nach 5 Tagen die Expression von α-sma, verglichen mit nur TGFβ-behandelten Fibroblasten. Dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant (Abb. 13). Die Reduktion von TGFβ1-induzierter α-sma-Expression durch zusätzliche Bestrahlung ist in der Kontrollgruppe, CTS, insgesamt weniger deutlich ausgeprägt (Abb. 11, 14). Die TGFβ1-vermittelte Zunahme der α-sma-Expression bei zusätzlicher Bestrahlung unterbleibt sowohl bei CTS- als auch MD-Zellen, unabhängig von der Behandlungsdauer. Ein Vergleich der α-sma-Expression von CTS- und MD-Zellen ergibt keine Unterschiede (s. Anhang IIIa).



**Abb. 12: α-sma 5 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot** mit (von links nach rechts) Standard, CTS-, MD-, CTS TGFβ, MD TGFβ, CTS 453 nm, MD 453 nm, CTS TGFβ + 453 nm, MD TGFβ + 453 nm



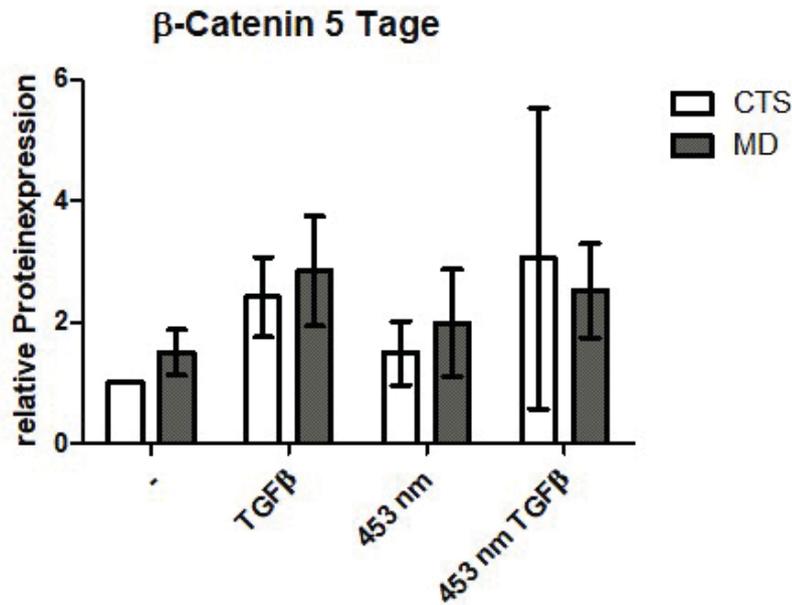
**Abb. 13: α-sma 5 Tage MD, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. MD-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05 (453 nm vs 453 nm+TGFβ), \*\* = p < 0,01 (- vs TGFβ) und \*\*\* = p < 0,005.



**Abb. 14: α-sma 5 Tage CTS, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. CTS-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 (- vs TGFβ) und \*\*\* = p < 0,005.

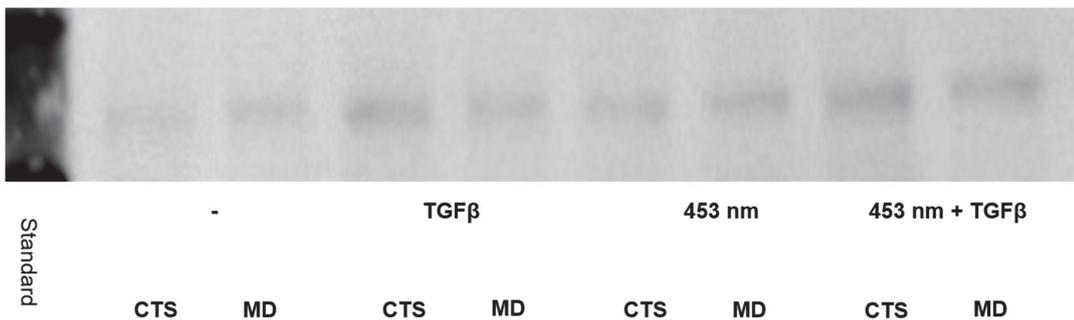
### 3.2.2 Beeinflussung der $\beta$ -Catenin-Expression durch Bestrahlung mit blauem Licht

Vergleicht man MD- und CTS-Fibroblasten, lässt sich bei der unbehandelten Kontrolle nach 5 Tagen eine geringfügig höhere  $\beta$ -Catenin-Expression in MD- Fibroblasten feststellen (Abb. 15).

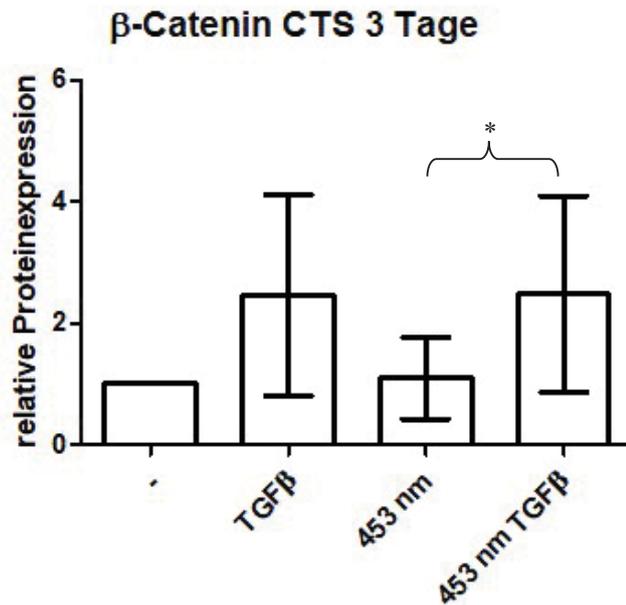


**Abb. 15:  $\beta$ -Catenin 5 Tage CTS vs MD, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle CTS. MD- und CTS-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGF $\beta$  aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 und \*\*\* = p < 0,005.

Nach 3 Tagen ist in TGF $\beta$ 1-behandelten bestrahlten CTS-Fibroblasten eine im Vergleich zu der bestrahlten Gruppe signifikante Zunahme der Expression von  $\beta$ -Catenin um mehr als das Doppelte nachzuweisen (Abb. 17). In MD-Fibroblasten findet sich nach 3 Tagen keine signifikante Beeinflussung (s. Anhang IIIb).

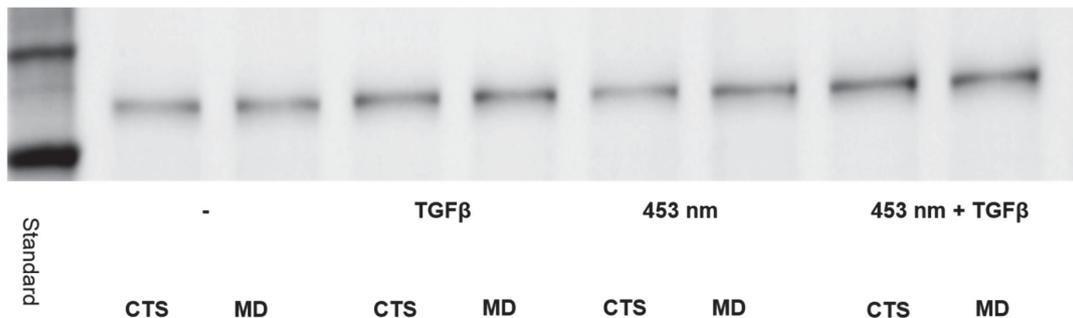


**Abb. 16:  $\beta$ -Catenin 3 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot** Mit (von links nach rechts) Standard, CTS-, MD-, CTS TGF $\beta$ , MD TGF $\beta$ , CTS 453 nm, MD 453 nm, CTS TGF $\beta$  + 453 nm, MD TGF $\beta$  + 453 nm

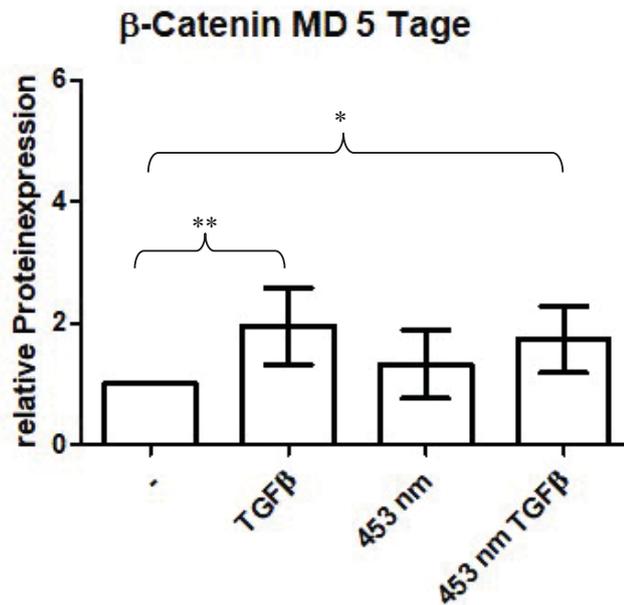


**Abb. 17: β-Catenin 3 Tage CTS, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. CTS-Fibroblasten wurden 3 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05 (453 nm vs 453 nm + TGFβ), \*\* = p < 0,01 und \*\*\* = p < 0,005.

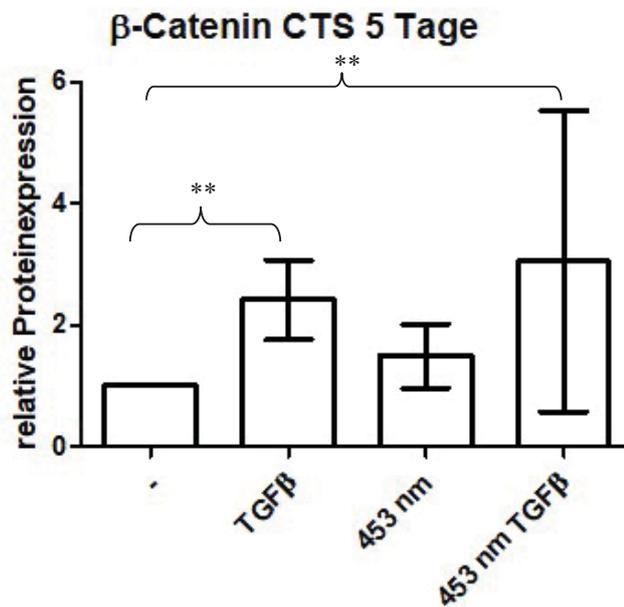
Nach 5 Tagen ist in CTS- und MD-Zellen eine im Vergleich mit der Kontrolle signifikante Vermehrung der Expression von β-Catenin in TGFβ- sowie in TGFβ + 453 nm behandelten Zellen auf das Doppelte (MD) bzw. 2,4 - 3fache (CTS) nachzuweisen (Abb. 19, 20).



**Abb. 18: β-Catenin 5 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot** Mit (von links nach rechts) Standard, CTS-, MD-, CTS TGFβ, MD TGFβ, CTS 453 nm, MD 453 nm, CTS TGFβ + 453 nm, MD TGFβ + 453 nm



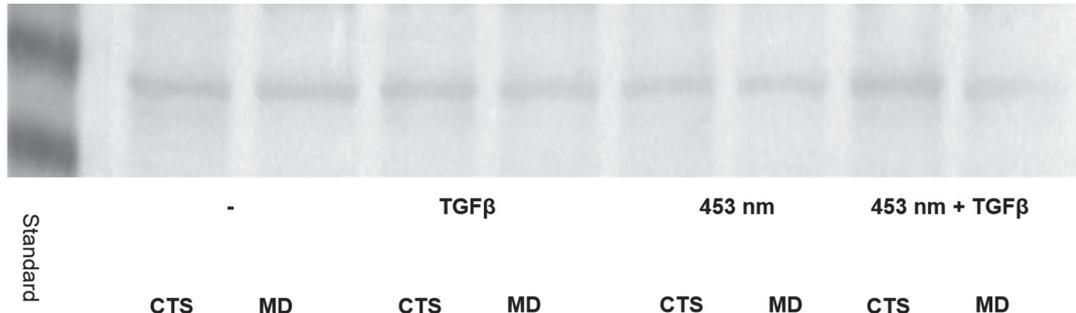
**Abb. 19: β-Catenin 5 Tage MD, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. MD-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05 (- vs 453 nm + TGFβ), \*\* = p < 0,01 (- vs TGFβ) und \*\*\* = p < 0,005.



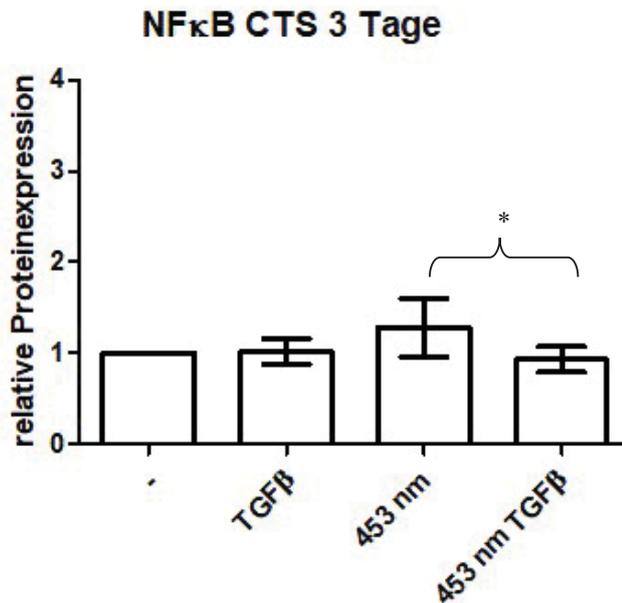
**Abb. 20: β-Catenin 5 Tage CTS, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. CTS-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 (- vs TGFβ, - vs 453 nm + TGFβ) und \*\*\* = p < 0,005.

### 3.2.3 Beeinflussung der NFκB-Expression durch Bestrahlung mit blauem Licht

Die Expression des Transkriptionsfaktors NFκB ist in der Gruppe der bestrahlten CTS-Fibroblasten nach 3 Tagen im Vergleich zu TGFβ1-behandelten und mit 453 nm bestrahlten CTS-Fibroblasten signifikant erhöht (Abb. 22).



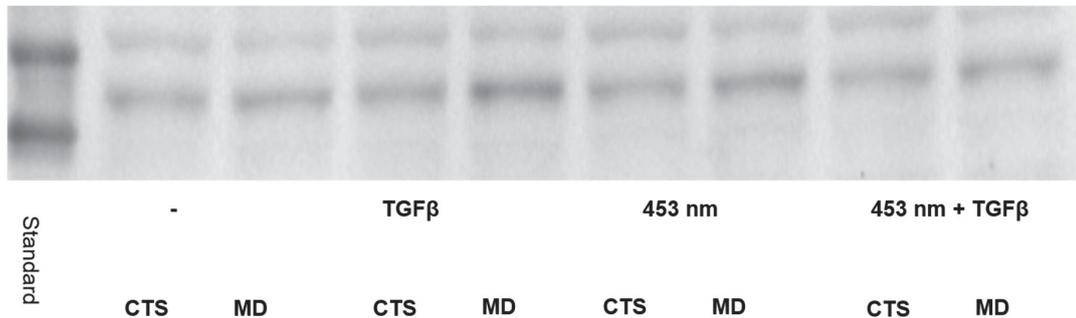
**Abb. 21: NFκB 3 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot** Mit (von links nach rechts) Standard, CTS-, MD-, CTS TGFβ, MD TGFβ, CTS 453 nm, MD 453 nm, CTS TGFβ + 453 nm, MD TGFβ + 453 nm



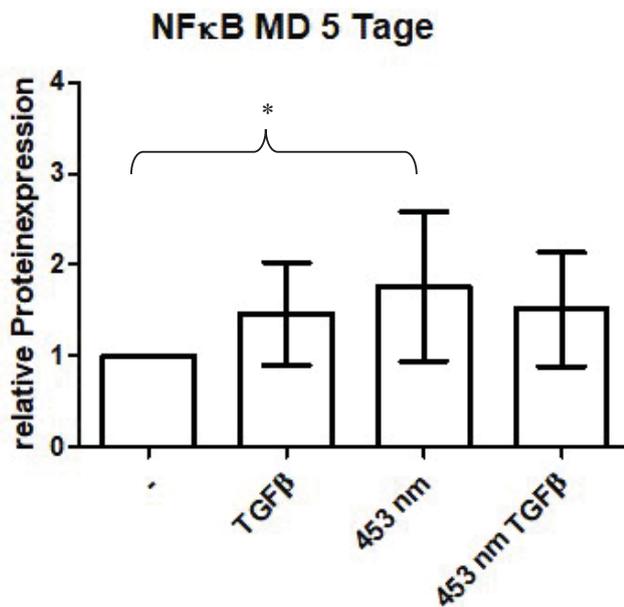
**Abb. 22: NFκB 3 Tage CTS, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. CTS-Fibroblasten wurden 3 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05 (453 nm vs 453 nm+TGFβ), \*\* = p < 0,01 und \*\*\* = p < 0,005.

Bestrahlte MD-Fibroblasten zeigen nach 5 Tagen, jedoch nicht nach 3 Tagen, verglichen mit der MD-Kontrolle eine Zunahme der Expression von NFκB (Abb. 24, s. Anhang IIIc). In CTS-Fibroblasten ist nach 5 Tagen keine Modulation der NFκB-Expression durch Bestrahlung

nachweisbar. Zwischen MD- und CTS-Fibroblasten besteht kein signifikanter Unterschied (s. Anhang IIIc).



**Abb. 23: NFκB 5 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot** Mit (von links nach rechts) Standard, CTS-, MD-, CTS TGFβ, MD TGFβ, CTS 453 nm, MD 453 nm, CTS TGFβ + 453 nm, MD TGFβ + 453 nm

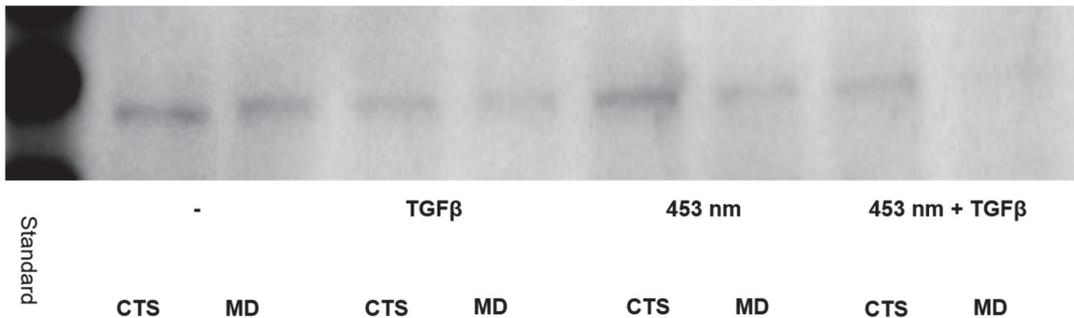


**Abb. 24: NFκB 5 Tage MD, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. MD-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05 (- vs 453 nm), \*\* = p < 0,01 und \*\*\* = p < 0,005.

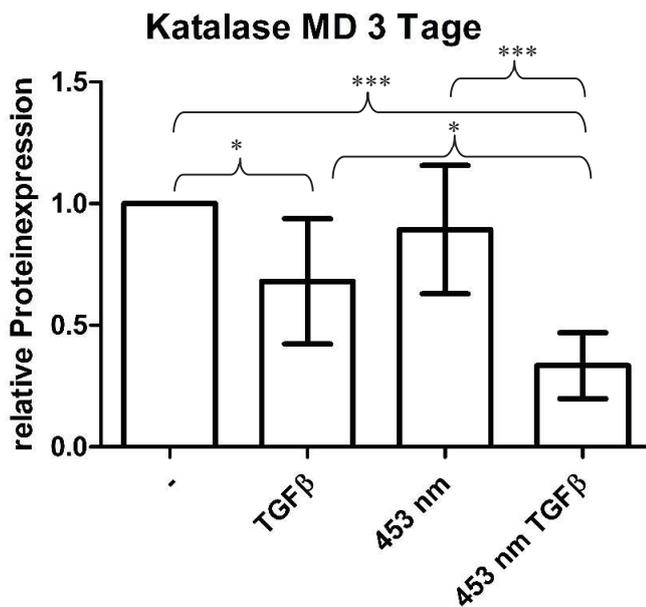
### 3.2.4 Beeinflussung der Katalase-Expression durch Bestrahlung mit blauem Licht

In TGFβ1-behandelten, bestrahlten MD-Fibroblasten fällt die Expression auf ca. 30 % der Expression der unbehandelten Kontrolle (p < 0,005) bzw. die Hälfte der mit TGFβ-behandelten MD-Fibroblasten. TGFβ1-Behandlung führt in MD-Zellen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle zu einer Reduktion der Katalase-Expression um ca. 40 %, (Abb. 26). Nach 3 Tagen wird in mit

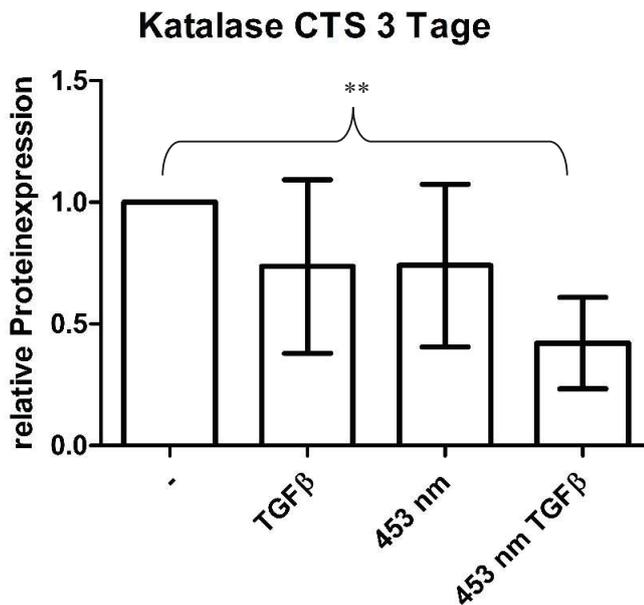
TGFβ1-behandelten, bestrahlten CTS-Fibroblasten die Katalase-Expression um mehr als die Hälfte verringert (Abb. 27).



**Abb. 25: Katalase 3 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot** Mit (von links nach rechts) Standard, CTS-, MD-, CTS TGFβ, MD TGFβ, CTS 453 nm, MD 453 nm, CTS TGFβ + 453 nm, MD TGFβ + 453 nm

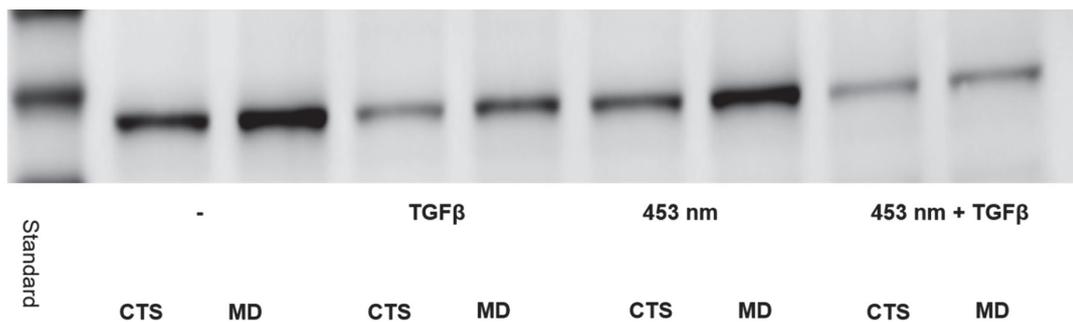


**Abb. 26: Katalase 3 Tage MD, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. MD-Fibroblasten wurden 3 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05 (- vs TGFβ, TGFβ vs 453 nm+TGFβ), \*\* = p < 0,01 und \*\*\* = p < 0,005 (- vs 453 nm+TGFβ, 453 nm vs 453 nm+TGFβ).

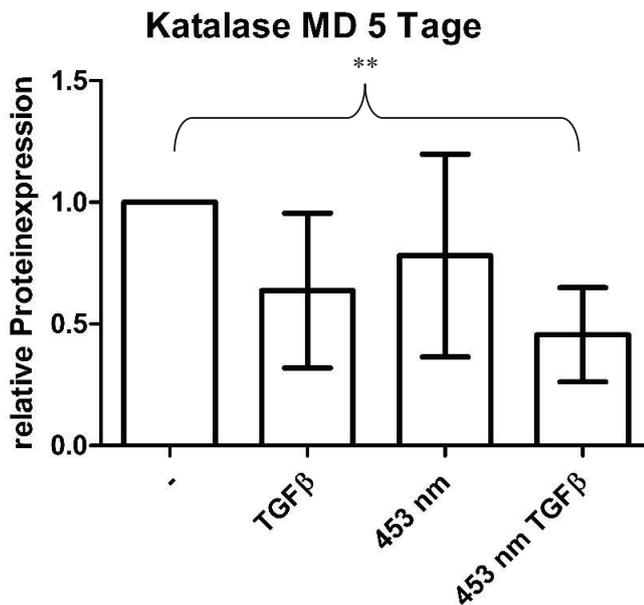


**Abb. 27: Katalase 3 Tage CTS, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. CTS-Fibroblasten wurden 3 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 (- vs 453 nm+TGFβ) und \*\*\* = p < 0,005.

Nach 5 Tagen lässt sich in den TGFβ1-behandelten, bestrahlten MD-Fibroblasten eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf ca. 45 % verringerte Katalase-Expression nachweisen (Abb. 29). CTS-Zellen zeigen nach 5 Tagen Behandlung keine veränderte Expression der Katalase, weiterhin besteht weder nach 3 noch 5 Tagen ein Unterschied zwischen CTS- und MD-Fibroblasten (s. Anhang III d).



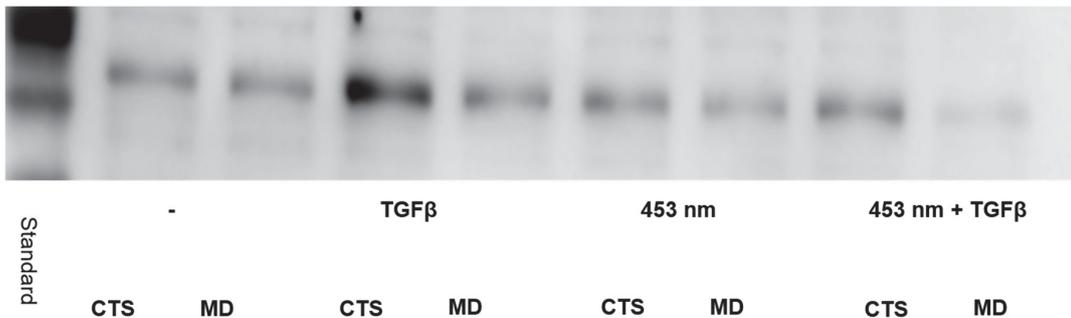
**Abb. 28: Katalase 5 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot** Mit (von links nach rechts) Standard, CTS-, MD-, CTS TGFβ, MD TGFβ, CTS 453 nm, MD 453 nm, CTS TGFβ + 453 nm, MD TGFβ + 453 nm



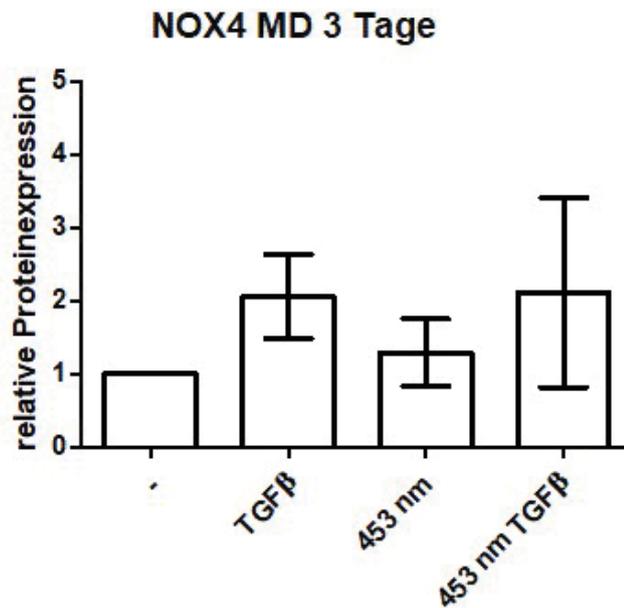
**Abb. 29: Katalase 5 Tage MD, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. MD-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 (- vs 453 nm+TGFβ) und \*\*\* = p < 0,005.

### 3.2.5 Beeinflussung der NOX4-Expression durch Bestrahlung mit blauem Licht

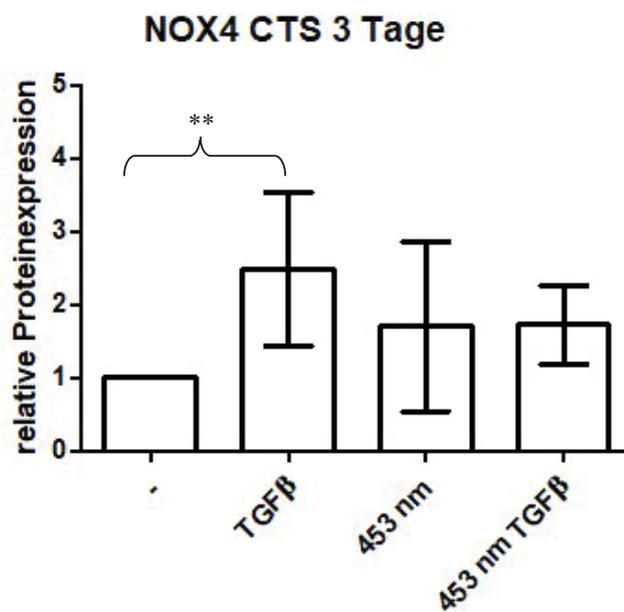
Nach 3 Tagen zeigt sich in MD- eine nicht signifikante und in CTS-Fibroblasten eine signifikante Verdopplung der NOX4-Expression durch Behandlung mit TGFβ1 (Abb. 31, 32).



**Abb. 30: NOX4 3 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot** Mit (von links nach rechts) Standard, CTS-, MD-, CTS TGFβ, MD TGFβ, CTS 453 nm, MD 453 nm, CTS TGFβ + 453 nm, MD TGFβ + 453 nm

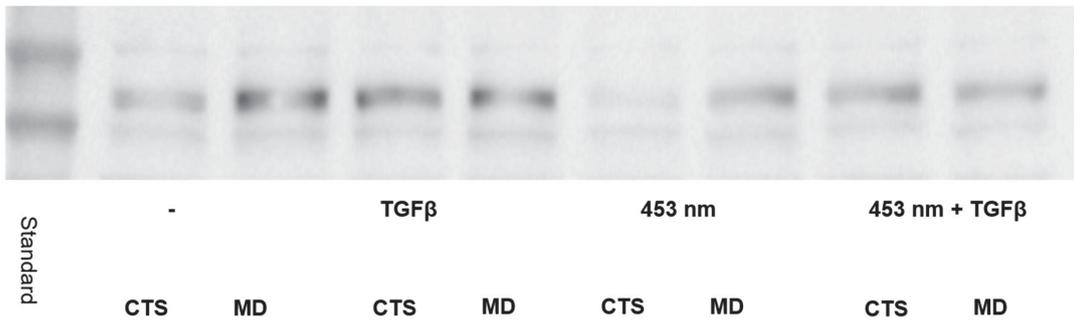


**Abb. 31: NOX4 3 Tage MD, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. MD-Fibroblasten wurden 3 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 und \*\*\* = p < 0,005.



**Abb. 32: NOX4 3 Tage CTS, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. CTS-Fibroblasten wurden 3 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 (- vs TGFβ) und \*\*\* = p < 0,005.

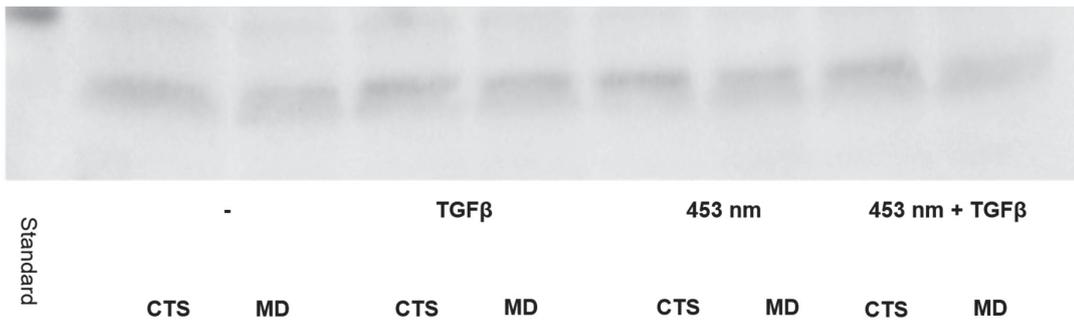
Im Zuge der 5-tägigen Behandlung sind keine Expressionsveränderungen der NOX4, weder in MD- noch CTS-Zellen, und keine Unterschiede der Expression zwischen MD- und CTS-Fibroblasten detektierbar (s. Anhang IIIe).



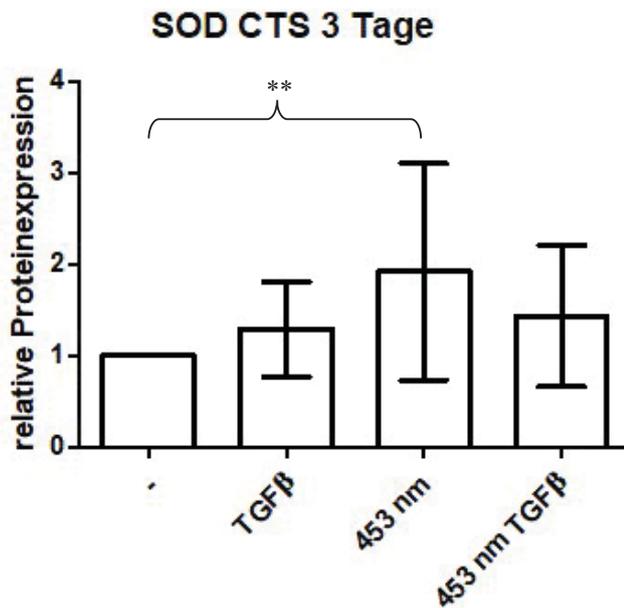
**Abb. 33: NOX4 5 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot** Mit (von links nach rechts) Standard, CTS-, MD-, CTS TGF $\beta$ , MD TGF $\beta$ , CTS 453 nm, MD 453 nm, CTS TGF $\beta$  + 453 nm, MD TGF $\beta$  + 453 nm

### 3.2.6 *Beeinflussung der SOD1-Expression durch Bestrahlung mit blauem Licht*

In CTS-Fibroblasten lässt sich die SOD1-Expression durch Bestrahlung mit 453 nm induzieren (Abb. 35). Es zeigen sich keine weiteren Auffälligkeiten der SOD1-Expression (s. Anhang IIIf).



**Abb. 34: SOD1 3 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot** Mit (von links nach rechts) Standard, CTS-, MD-, CTS TGF $\beta$ , MD TGF $\beta$ , CTS 453 nm, MD 453 nm, CTS TGF $\beta$  + 453 nm, MD TGF $\beta$  + 453 nm



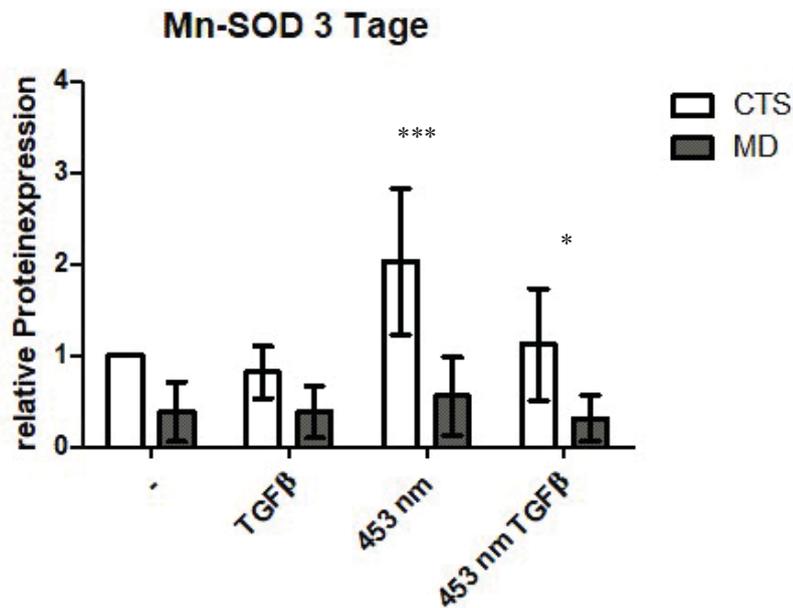
**Abb. 35: SOD1 3 Tage CTS, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. CTS-Fibroblasten wurden 3 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 (- vs 453 nm) und \*\*\* = p < 0,005.



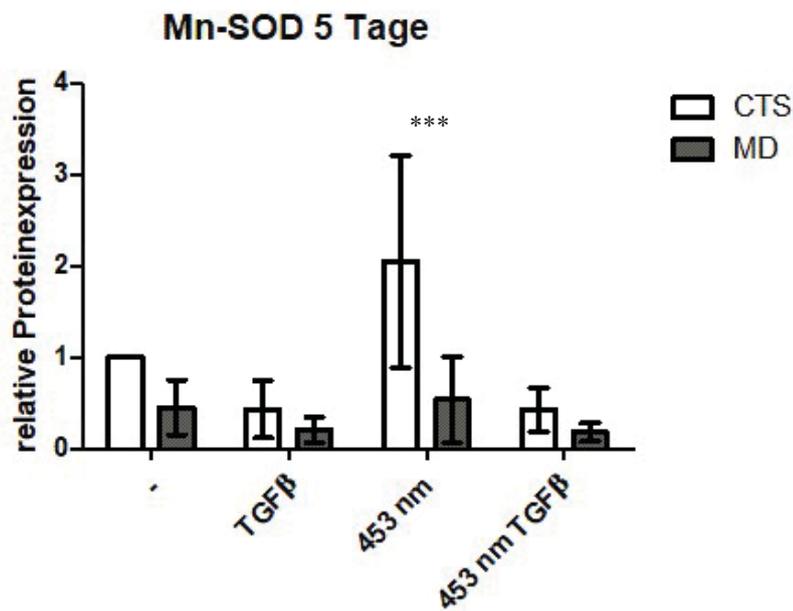
**Abb. 36: SOD1 5 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot** Mit (von links nach rechts) Standard, CTS-, MD-, CTS TGFβ, MD TGFβ, CTS 453 nm, MD 453 nm, CTS TGFβ + 453 nm, MD TGFβ + 453 nm

### 3.2.7 Beeinflussung der Mn-SOD-Expression durch Bestrahlung mit blauem Licht

Die Mn-SOD-Expression in MD-Fibroblasten ist, im Vergleich zu CTS-Fibroblasten, tendenziell geringer (Abb. 37, 38). Nach 3 Tagen sind diese Unterschiede deutlicher zu sehen (Abb. 37) und sowohl bei TGFβ + 453 nm als auch 453 nm signifikant. Bei 453 nm besteht ein maximaler Differenzfaktor von 1,5 zwischen CTS und MD (p < 0,005). Nach 5 Tagen Behandlung ist der Unterschied weniger signifikant, wie in Abb. 38 dargestellt ist.

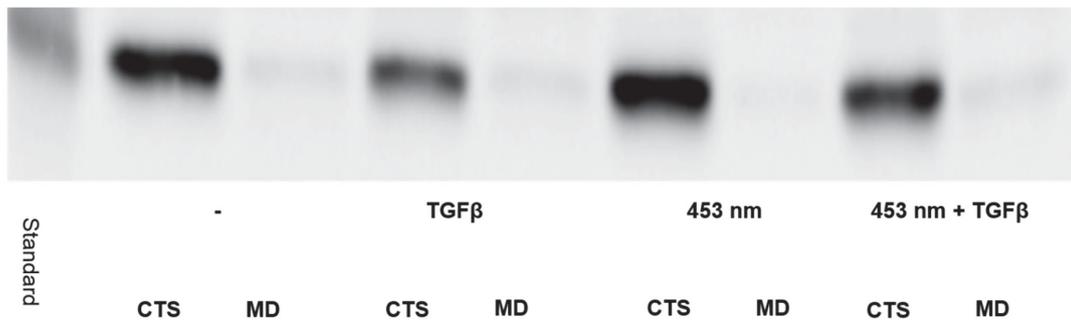


**Abb. 37: Mn-SOD 3 Tage CTS vs MD, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die CTS-Kontrolle. MD- und CTS-Fibroblasten wurden 3 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05 (CTS vs MD 453 nm + TGFβ), \*\* = p < 0,01 und \*\*\* = p < 0,005 (CTS vs MD 453 nm).

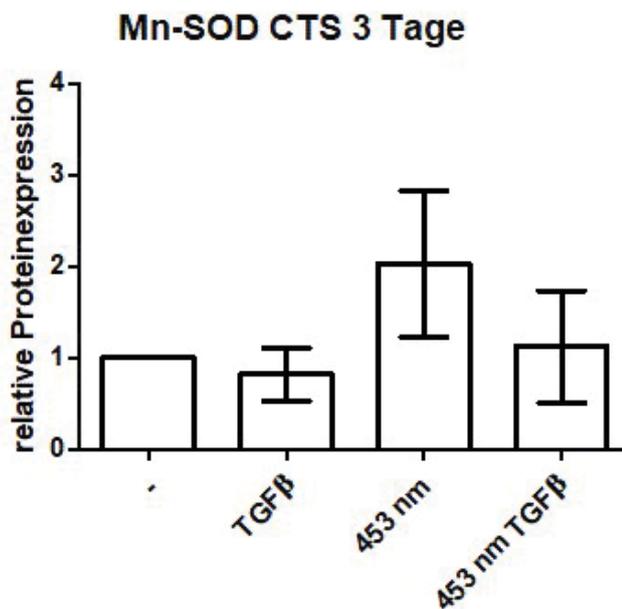


**Abb. 38: Mn-SOD 5 Tage CTS vs MD, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die CTS-Kontrolle. MD- und CTS-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 und \*\*\* = p < 0,005 (CTS vs MD 453 nm).

Nach 3 Tagen Behandlung sieht man bei den mit 453 nm bestrahlten CTS-Fibroblasten eine tendenzielle, nicht signifikante Verdoppelung der Mn-SOD-Expression (Abb. 40). Dieser Effekt ist in MD-Fibroblasten nicht zu finden (s. Anhang IIIg).



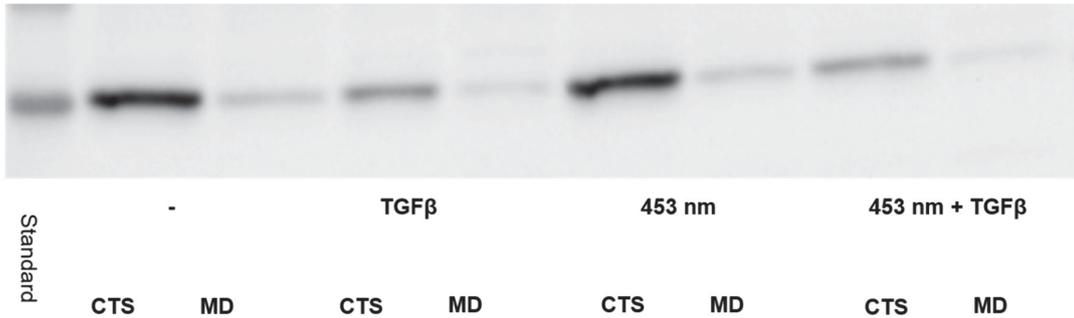
**Abb. 39: Mn-SOD 3 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot** Mit (von links nach rechts) Standard, CTS-, MD-, CTS TGFβ, MD TGFβ, CTS 453 nm, MD 453 nm, CTS TGFβ + 453 nm, MD TGFβ + 453 nm



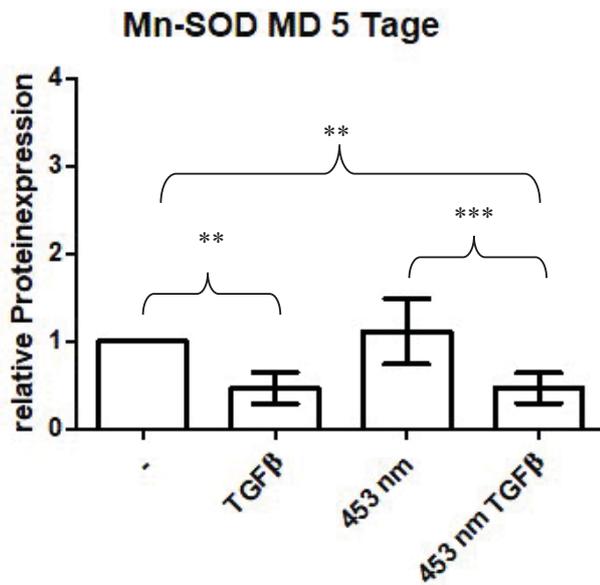
**Abb. 40: Mn-SOD 3 Tage CTS, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. CTS-Fibroblasten wurden 3 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 und \*\*\* = p < 0,005.

Die 5 Tage behandelten MD-Fibroblasten zeigen in Anwesenheit von TGFβ1 und TGFβ1 sowie zusätzlicher Bestrahlung eine Inhibition der Mn-SOD-Expression auf ca. 46 % der unbehandelten Kontrolle (p < 0,01). Dieser Unterschied findet sich ebenfalls zwischen bestrahlten und bestrahlten, TGFβ1-behandelten MD-Fibroblasten (Abb. 42). Nach 5-tägiger Behandlung besteht zwischen

bestrahlten und zusätzlich mit TGFβ1-behandelten CTS-Fibroblasten ein signifikanter Unterschied (Abb. 43).



**Abb. 41: Mn-SOD 5 Tage CTS vs MD, exemplarischer Western Blot** Mit (von links nach rechts) Standard, CTS-, MD-, CTS TGFβ, MD TGFβ, CTS 453 nm, MD 453 nm, CTS TGFβ + 453 nm, MD TGFβ + 453 nm



**Abb. 42: Mn-SOD 5 Tage MD, (n = 8)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. MD-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 (- vs TGFβ, - vs 453 nm + TGFβ) und \*\*\* = p < 0,005 (453 nm vs 453 nm + TGFβ).

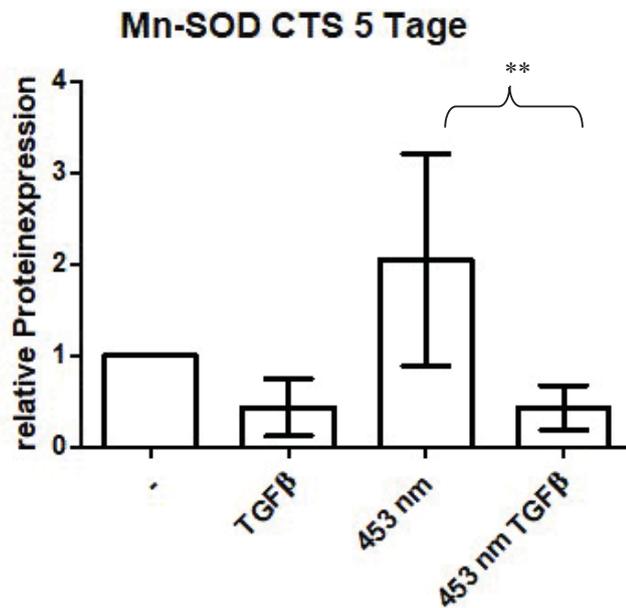
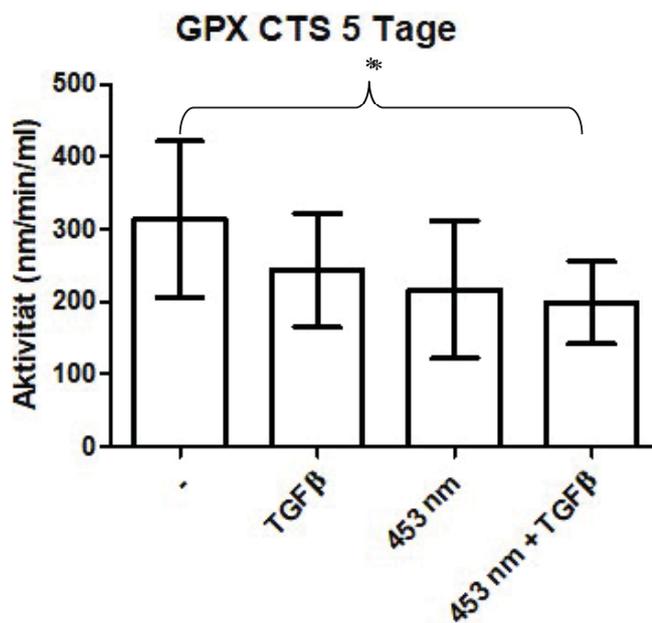


Abb. 43: Mn-SOD 5 Tage CTS, (n = 8) Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle. CTS-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 (453 nm vs 453 nm + TGFβ) und \*\*\* = p < 0,005.

### 3.3 Untersuchung der Aktivität der GPX

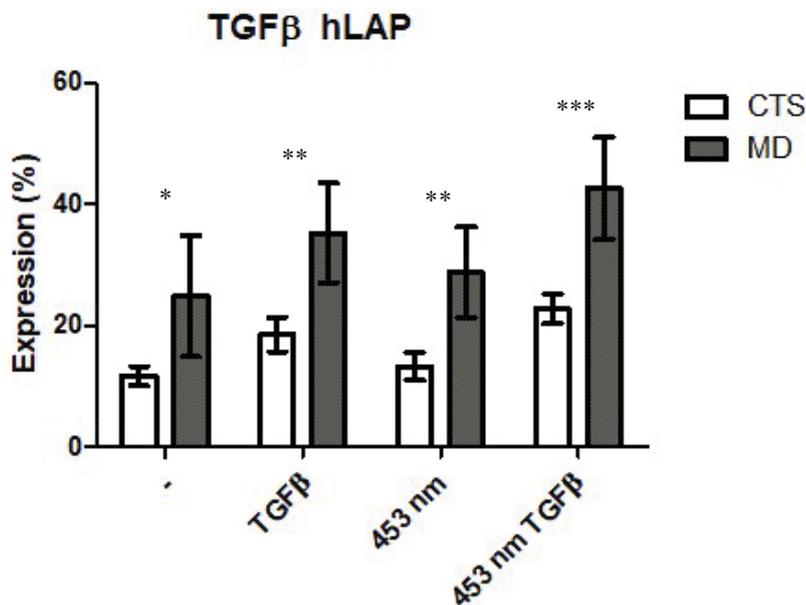
Es ist kein Unterschied der GPX-Aktivität zwischen MD- und CTS-Fibroblasten nachweisbar (s. Anhang IIIj). Nach 5 Tagen ist in CTS-Fibroblasten durch TGFβ1-Aktivierung und zusätzliche Bestrahlung eine Aktivitätsabnahme um ca. 1/3 erkennbar (Abb. 44).



**Abb. 44: GPX 5 Tage CTS, (n = 9)** Veränderung der GPX-Aktivität in nm/min/ml. MD- und CTS-Fibroblasten wurden 3 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05 (- vs 453 nm + TGFβ), \*\* = p < 0,01 und \*\*\* = p < 0,005.

### 3.4 Durchflusszytometrische Analyse der TGF-Rezeptoren und TGFβ hLAP

Mittels durchflusszytometrischer Analyse konnte festgestellt werden, dass latency associated peptide LAP in MD verstärkt exprimiert wird als in CTS. Im Mittel zeigen MD-Fibroblasten, unabhängig von der Behandlung, doppelt so viel LAP an der Oberfläche wie CTS (Abb. 45). Die Analysen der Rezeptoren ALK 5, 3, 7 und TGFβ-R II zeigen keine signifikanten Unterschiede (s. Anhang IIIh).



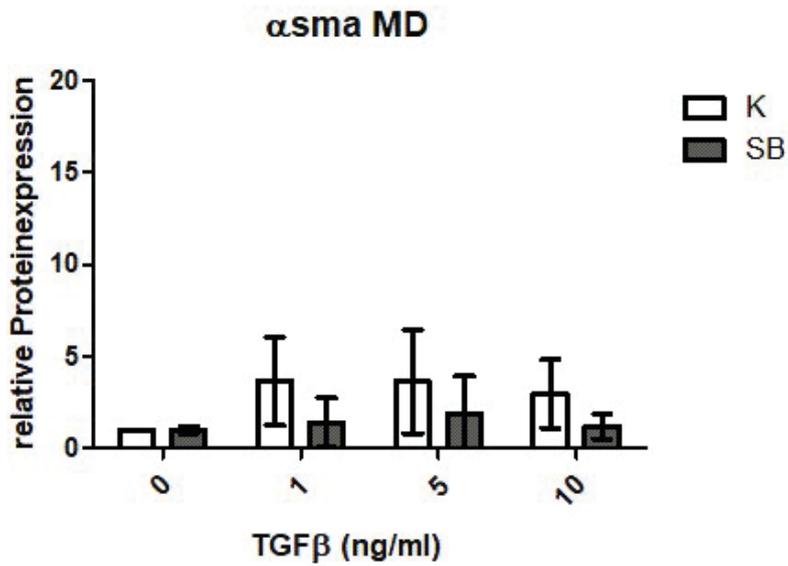
**Abb. 45: FACS TGFβ hLAP CTS vs MD, (n = 8)** Prozentuale Expression, bezogen auf CTS-Kontrolle. MD- und CTS-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 40 J/cm<sup>2</sup> (453 nm) bestrahlt und/oder mit TGFβ aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05 (CTS vs MD -), \*\* = p < 0,01 (CTS vs MD TGFβ, CTS vs MD 453 nm) und \*\*\* = p < 0,005 (CTS vs MD 453 nm + TGFβ).

### 3.5 Behandlung der Fibroblasten mit SB-431542

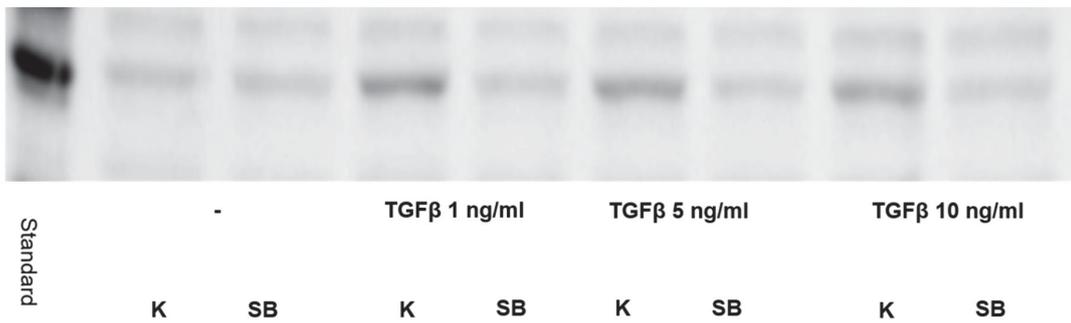
Aufgrund der erhöhten Expression von hLAP folgte die Untersuchung des Effektes eines TGFβ-Inhibitors, SB-431542, auf den Surrogatparameter der Myofibroblastengnese α-sma und ROS-modulierende Enzyme in MD- und CTS-Fibroblasten.

#### 3.5.1 Beeinflussung der α-sma-Expression durch SB-Behandlung

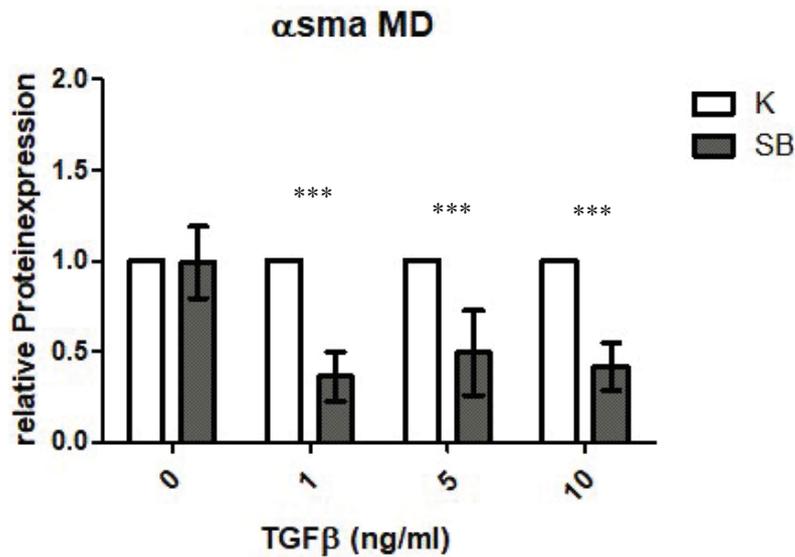
Es zeigt sich eine Inhibition der TGFβ1-induzierten α-sma-Expression durch SB-Zugabe (Abb. 46, 48, 49, 51). Dieser inhibierende Effekt ist sowohl in MD- als auch CTS-Fibroblasten erkennbar. Vergleicht man zwischen SB und Kontrolle innerhalb der jeweiligen TGFβ-Konzentrationsgruppe, ist die Inhibition der α-sma-Expression signifikant (Abb. 48, 51).



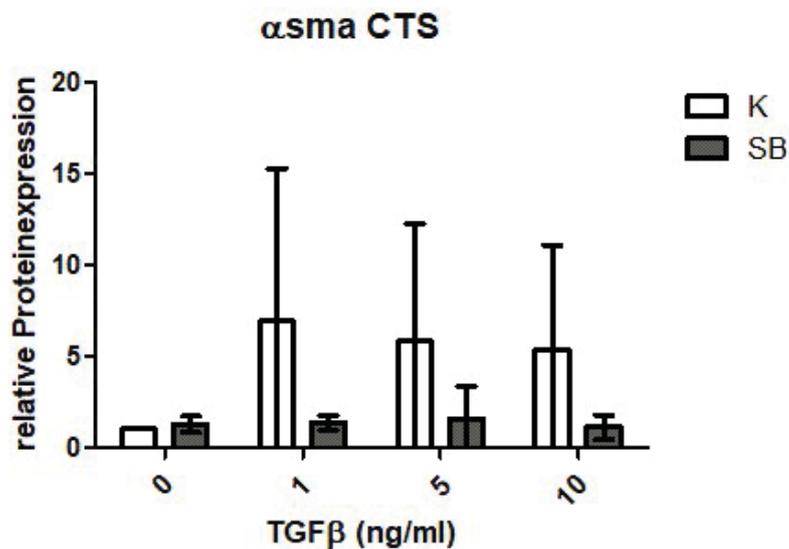
**Abb. 46:  $\alpha$ -sma MD, K vs SB, (n = 5)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die TGF $\beta$ -unbehandelte Kontrolle. MD-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 0,5  $\mu$ Mol SB-431542 behandelt und/oder mit TGF $\beta$  1-5-10 ng/ml aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 und \*\*\* = p < 0,005.



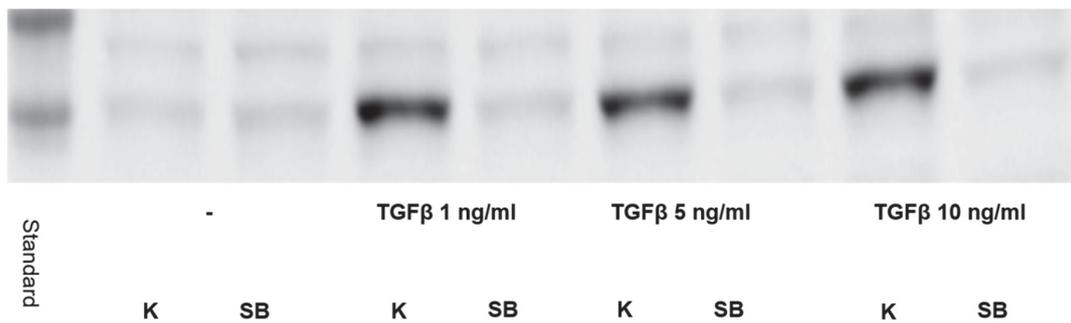
**Abb. 47:  $\alpha$ -sma MD, K vs SB, exemplarischer Western Blot** Mit (von links nach rechts) Standard, K-, SB-, K+TGF $\beta$  1 ng/ml, SB+TGF $\beta$  1 ng/ml, K+TGF $\beta$  5 ng/ml, SB+TGF $\beta$  5 ng/ml, K+TGF $\beta$  10 ng/ml, SB+TGF $\beta$  10 ng/ml.



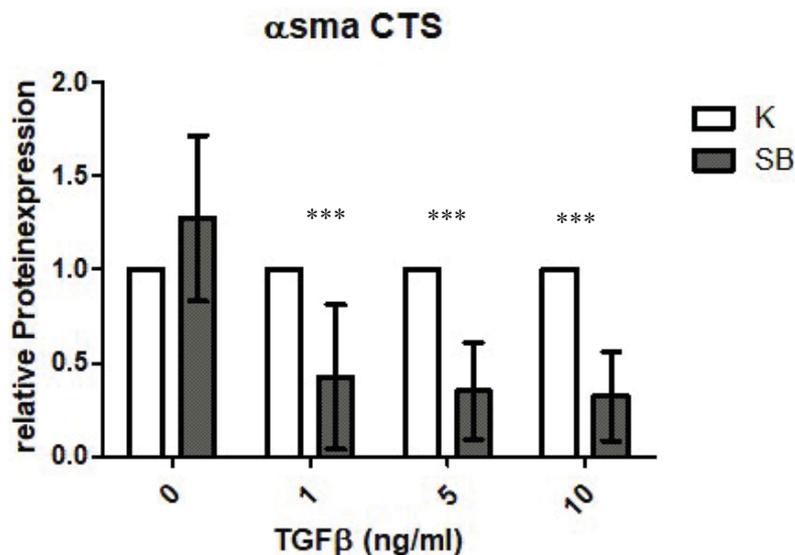
**Abb. 48: α-sma MD, K vs SB, normiert auf jeweiliges TGF, (n = 5)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle der jeweiligen TGFβ-Behandlung. MD-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 0,5 μMol SB-431542 behandelt und/oder mit TGFβ 1-5-10 ng/ml aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 und \*\*\* = p < 0,005 (K 1ng/ml TGFβ vs SB 1 ng/ml TGFβ, K 5 ng/ml TGFβ vs SB 5 ng/ml TGFβ, K 10 ng/ml TGFβ vs SB 10 ng/ml TGFβ).



**Abb. 49: α-sma CTS, K vs SB, (n = 5)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die TGFβ-unbehandelte Kontrolle. CTS-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 0,5 μMol SB-431542 behandelt und/oder mit TGFβ 1-5-10 ng/ml aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 und \*\*\* = p < 0,005.



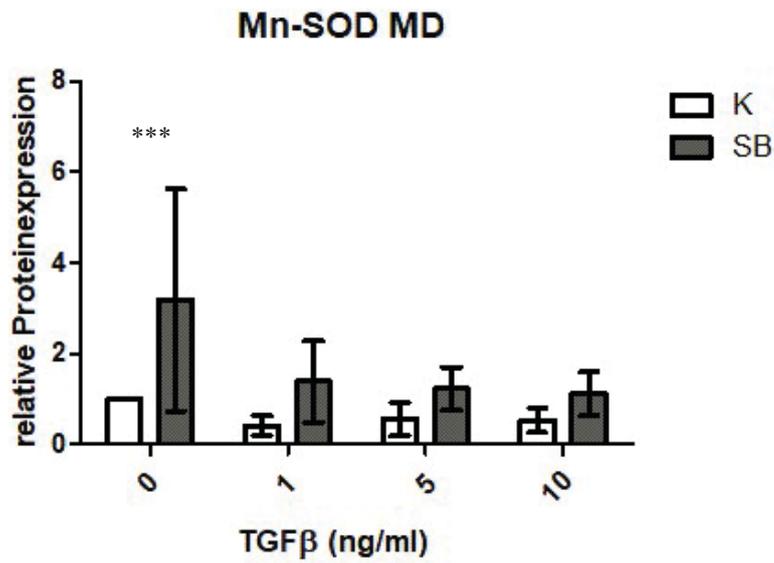
**Abb. 50:  $\alpha$ -sma CTS, K vs SB, exemplarischer Western Blot** Mit (von links nach rechts) Standard, K-, SB-, K+TGF $\beta$  1 ng/ml, SB+TGF $\beta$  1 ng/ml, K+TGF $\beta$  5 ng/ml, SB+TGF $\beta$  5 ng/ml, K+TGF $\beta$  10 ng/ml, SB+TGF $\beta$  10 ng/ml.



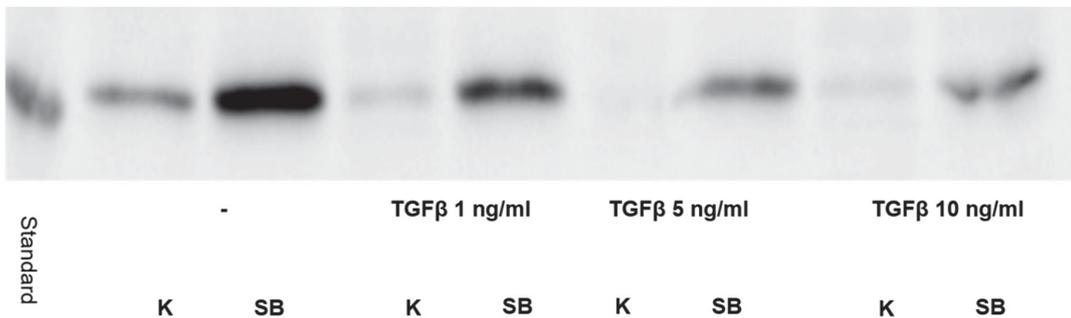
**Abb. 51:  $\alpha$ -sma CTS, K vs SB, normiert auf jeweiliges TGF, (n = 5)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die Kontrolle der jeweiligen TGF $\beta$ -Behandlung. CTS-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 0,5  $\mu$ Mol SB-431542 behandelt und/oder mit TGF $\beta$  1-5-10 ng/ml aktiviert. Signifikanz \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  und \*\*\* =  $p < 0,005$  (K 1 ng/ml TGF $\beta$  vs SB 1 ng/ml TGF $\beta$ , K 5 ng/ml TGF $\beta$  vs SB 5 ng/ml TGF $\beta$ , K 10 ng/ml TGF $\beta$  vs SB 10 ng/ml TGF $\beta$ ).

### 3.5.2 Beeinflussung der Mn-SOD-Expression durch SB-Behandlung

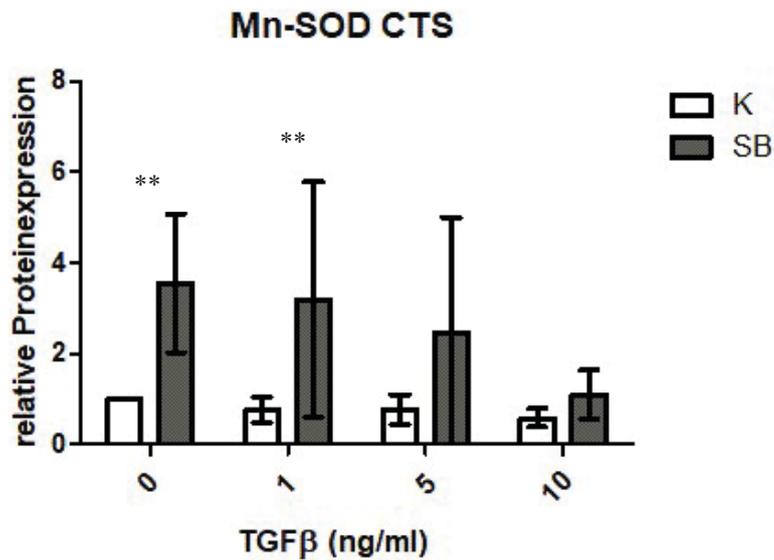
Die Mn-SOD-Expression wird sowohl in MD- (Abb. 52) als auch CTS-Fibroblasten (Abb. 54) durch Zugabe von SB-431542 induziert. Signifikant ist diese Zunahme durch SB bei TGF $\beta$  unbehandelten CTS- und MD-Fibroblasten. Im CTS bleibt die Induktion bei simultaner Behandlung mit TGF $\beta$ 1 (1 ng/ml) signifikant (Abb. 54).



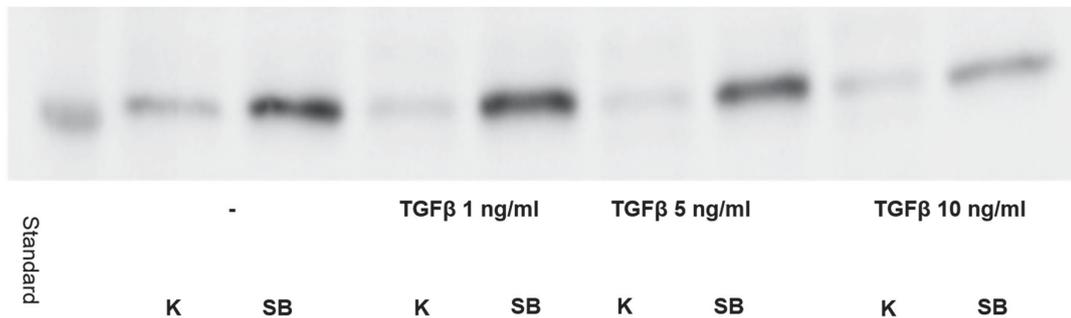
**Abb. 52: Mn-SOD MD, K vs SB, (n = 5)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die TGFβ-unbehandelte Kontrolle. MD-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 0,5 μMol SB-431542 behandelt und/oder mit TGFβ 1-5-10 ng/ml aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 und \*\*\* = p < 0,005 (K- vs SB-).



**Abb. 53: Mn-SOD MD, K vs SB, exemplarischer Western Blot** Mit (von links nach rechts) Standard, K-, SB-, K+TGFβ 1 ng/ml, SB+TGFβ 1 ng/ml, K+TGFβ 5 ng/ml, SB+TGFβ 5 ng/ml, K+TGFβ 10 ng/ml, SB+TGFβ 10 ng/ml.



**Abb. 54: Mn-SOD CTS, K vs SB, (n = 5)** Relative Veränderung der Expression, bezogen auf die TGFβ-unbehandelte Kontrolle. CTS-Fibroblasten wurden 5 Tage mit 0,5 μMol SB-431542 behandelt und/oder mit TGFβ 1-5-10 ng/ml aktiviert. Signifikanz \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01 (K- vs SB-, K 1 ng/ml TGFβ vs SB 1 ng/ml TGFβ) und \*\*\* = p < 0,005.



**Abb. 55: Mn-SOD CTS, K vs SB, exemplarischer Western Blot** Mit (von links nach rechts) Standard, K-, SB-, K+TGFβ 1 ng/ml, SB+TGFβ 1 ng/ml, K+TGFβ 5 ng/ml, SB+TGFβ 5 ng/ml, K+TGFβ 10 ng/ml, SB+TGFβ 10 ng/ml.

### 3.5.3 Beeinflussung der NOX4- und Katalase-Expression durch SB-Behandlung

NOX4 und Katalase zeigen weder in MD- noch CTS-Fibroblasten Veränderungen der Expression durch SB-Behandlung (Anhang IIIi).

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit sollten die Veränderungen der ROS-modulierenden Enzyme und assoziierter Transkriptionsfaktoren durch Bestrahlung mit blauem Licht in MD- Fibroblasten im Vergleich zu Fibroblasten aus Referenzgewebe (CTS) untersucht werden. Ziel war es, eine mögliche Quelle der in MD erhöhten Basis-ROS-Level und der bestrahlungsassoziierten Induktion von ROS zu identifizieren. Weiterhin wurde der Einfluss eines TGF $\beta$ 1-Inhibitors auf diese ROS-modulierenden Systeme untersucht, da die Inhibition der TGF $\beta$ -Wirkung einen ähnlichen Effekt wie blaues Licht auf die Myofibroblasteninduktion hat. Auch die Expression von TGF $\beta$ -Rezeptoren auf MD- und CTS-Fibroblasten wurde untersucht, um hier mögliche Unterschiede und Beeinflussung durch blaues Licht zu identifizieren.

Die im Rahmen dieser experimentellen Arbeit gewonnenen Daten sind reproduzierbar und zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

### 4.1 Modulation der $\alpha$ -sma- und TGF $\beta$ hLAP-Expression in CTS und MD

TGF $\beta$ 1 ist in der Lage,  $\alpha$ -sma, welches als Surrogatparameter für Myofibroblastengnese gilt, in Fibroblasten, und damit deren Differenzierung zu Myofibroblasten, zu induzieren (Desmouliere et al., 1993, Darby et al., 1990). Es wurde beschrieben, dass Bestrahlung mit blauem Licht sowohl in humanen dermalen Fibroblasten als auch MD-Fibroblasten die durch TGF $\beta$ 1 induzierte Expressionszunahme von  $\alpha$ -sma verhindern kann (Taflinski et al., 2014, Krassovka et al., 2019). Diese Ergebnisse lassen sich in dieser Arbeit bestätigen: Sowohl nach 3 als auch 5 Tagen bleibt in MD- und CTS-Fibroblasten die Induktion der  $\alpha$ -sma-Expression durch TGF $\beta$ 1 bei zusätzlicher Bestrahlung aus, in MD-Zellen wird sie nach 3 Tagen durch zusätzliche Bestrahlung sogar inhibiert (Abb. 10, 11, 13, 14). Die Myofibroblasten-Induktion durch TGF $\beta$ 1 dient hierbei als in vitro Annäherung an die in vivo Myofibroblastengnese in fibrotischen Erkrankungen wie MD. Dies deutet auf einen antifibrotischen Effekt der Bestrahlung hin und könnte für eine Therapie des MD von Interesse sein.

Es wird vermutet, dass Bestrahlung mit blauem Licht ROS induzieren kann, und inwieweit dieser Effekt bei der Vermittlung des antifibrotischen Effektes der ROS beteiligt sein könnte, war Gegenstand dieser Arbeit. Eine mögliche Verbindung von ROS und blauem Licht ist naheliegend, da ROS durch Bestrahlung mit blauem Licht induziert werden können (Mamalis et al., 2015, Taflinski et al., 2014, Opländer et al., 2011). Die Zugabe von Resveratrol (ein potentes pflanzliches Antioxidans aus der Gruppe der Polyphenole) in humanen dermalen Fibroblasten kann überdies den Effekt des blauen Lichtes auf ROS-Generation und Veränderung der Migrationsgeschwindigkeit unterbinden (Mamalis et al., 2016). Aus diesem Grund war es von Interesse, ob ROS einen vergleichbaren Effekt wie blaues Licht auf MD-Fibroblasten haben. In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass auch die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Myofibroblastengnese reduzieren kann

(Abb. 5-8). Es ist daher möglich, dass die Bestrahlungs-induzierte Generation von ROS für die Vermittlung des Bestrahlungseffektes von zentraler Bedeutung ist. Dies ist insofern interessant, weil auch profibrotische Effekte von ROS beschrieben wurden: ROS spielen eine Rolle in der durch TGF $\beta$ 1-induzierten Myofibrogenese (Murphy-Marshman et al., 2017), sie können  $\alpha$ -sma und Kollagen Typ 1 induzieren (Bocchino et al., 2010) und in der fibroproliferativen Erkrankung MD lasse sich höhere Basislevel von ROS nachweisen (Murrell et al., 1987, Nicula et al., 2014). Niedrige ROS-Konzentrationen fördern die Fibroblastenproliferation, während höhere Konzentrationen zelltoxisch sein können (Murrell et al., 1990). Die erhöhten ROS-Basislevel in MD-Fibroblasten könnten demzufolge für die profibrotischen Eigenschaften der Erkrankung mitverantwortlich sein, wie es von Murrell bereits postuliert wurde (Murrell et al., 1987). Wir konnten jedoch zeigen, dass die additive Zugabe von ROS die Myofibroblastengenesse hemmen kann. In Zusammenschau mit bisherigen, bereits erwähnten Ergebnissen (Mamalis et al., 2015, Opländer et al., 2011, Mamalis et al., 2016, Tafliński et al., 2014) deutet dies darauf hin, dass ROS für den Effekt der Bestrahlung ausschlaggebend sein könnten. Durch die weitere Zunahme der ROS in MD durch die Bestrahlung scheint die ROS-Wirkung sich von profibrotisch hin zu antifibrotisch zu verändern. Insgesamt sind die Ergebnisse mit der These vereinbar, dass durch Bestrahlung H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert wird, was den antifibrotischen und potenziell therapeutischen Effekt der Bestrahlung vermitteln könnte.

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigt sich weiterhin in MD-Fibroblasten eine erhöhte Expression von TGF $\beta$  hLAP (Abb. 45). Wie einleitend erwähnt, wird TGF $\beta$  mit LAP als *small latent complex* synthetisiert und muss erst aus diesem freigesetzt werden, um seine Wirkung entfalten zu können (Gray und Mason, 1990, Annes et al., 2003). Es ist bereits bekannt, dass TGF $\beta$  vermehrt von Zellen exprimiert wird, die mitochondrialem oder metabolischem Stress ausgesetzt sind (Amuthan et al., 2001). In MD-Fibroblasten lassen sich höhere Level von TGF $\beta$ 1 nachweisen (Badalamente et al., 1996, Krause et al., 2011). Es wurde weiterhin beschrieben, dass LAP in squamösen Karzinomzellen an  $\alpha$ v $\beta$ 6 Integrin gebunden vorliegt und dort das Verhalten der Zelle moduliert (Thomas et al., 2002). Es ist noch ungeklärt, ob das in dieser Arbeit detektierte hLAP Einfluss auf die MD-Zellen ausübt und z. B. auch an Integrine gebunden vorliegt, oder ob es sich um vom übermäßig vorhandenen TGF $\beta$  abgespaltenes oder konformationsverändertes hLAP ohne Einfluss auf die Zelle handelt. Auch durch ROS kann es zu einer Aktivierung von TGF $\beta$  hLAP kommen (Barcellos-Hoff und Dix, 1996). Sie führen eventuell zu einer Konformationsänderung des LAPs, sodass dieses das TGF $\beta$ 1 aus dem Komplex freigibt, wodurch die aktive Form des TGF $\beta$  entsteht (Jobling et al., 2006). Diese Mechanismen könnten in MD-Fibroblasten, in denen vermehrt ROS vorliegen, zum Tragen kommen. Zur Klärung der Bedeutung und Herkunft des in dieser Arbeit vermehrt nachzuweisendem hLAP sind weitere Untersuchungen nötig.

Da in dieser Arbeit vermehrt TGF $\beta$  hLAP in den MD-Fibroblasten nachweisbar war, wurde der Einfluss einer TGF $\beta$ -Rezeptor Inhibition untersucht. Durch die Zugabe von SB-431542 kann eine

Inhibition bzw. eine fehlende Induktion der  $\alpha$ -sma-Expression bestätigt werden (Abb. 46, 48, 49, 51). Aufgrund der niedrigen n-Zahl von  $n = 5$  sind die Ergebnisse nicht signifikant, aus anderen Arbeiten ist jedoch bereits bekannt, dass durch die Zugabe von SB-431542 eine Kontraktilitäts- und  $\alpha$ -sma-Inhibition in MD erreicht werden kann (Seßler, 2017, Krause et al., 2011). Es ergibt sich daher neben der Bestrahlung eine weitere mögliche Therapieoption des MD.

## 4.2 Die Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren durch Bestrahlung

Um herauszufinden, ob mit ROS oder Fibrose assoziierte Signalwege in MD und bei Bestrahlung verändert sind, wurden die  $\beta$ -Catenin- und NF $\kappa$ B-Expression untersucht. Es finden sich erhöhte Level von  $\beta$ -Catenin in MD (Varallo et al., 2003a, Howard et al., 2003), dies ist auch in dieser Arbeit tendenziell nach 5 Tagen nachweisbar (Abb. 15). CTS- und MD-Fibroblasten zeigen nach 5-tägiger Behandlung mit TGF $\beta$ 1 eine Induktion der  $\beta$ -Catenin-Expression, sowohl mit als auch ohne zusätzliche Bestrahlung (Abb. 19, 20). Dieser Zusammenhang stimmt mit publizierten Ergebnissen überein. Die Expression des Transkriptionsfaktors  $\beta$ -Catenin wird nach vorhergehenden Berichten durch TGF $\beta$  in Fibroblasten induziert (Amini Nik et al., 2007). Auch in Keloidgewebe und hypertrophen Narben ist eine Induktion von  $\beta$ -Catenin durch TGF $\beta$ 1 bekannt (Sun et al., 2015), und es konnte bereits detektiert werden, dass TGF $\beta$  eine nukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin in kultivierten Fibroblasten induziert (Akhmetshina et al., 2012). Die Aktivierung des Wnt-Signalweges, der zur nukleären und zytoplasmatischen Akkumulation von  $\beta$ -Catenin führt, ist für die durch TGF $\beta$  vermittelte Fibrose essenziell, und Fibroblasten benötigen  $\beta$ -Catenin, damit TGF $\beta$  Proliferation induzieren kann (Cheon et al., 2006, Akhmetshina et al., 2012). In pulmonalen epithelialen Zellen konnte durch Inhibition von  $\beta$ -Catenin die durch TGF $\beta$  gesteuerte  $\alpha$ -sma-Induktion verhindert werden (Xu et al., 2017), wodurch die Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors für die Myofibroblastengnese gezeigt wird. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen  $\beta$ -Catenin und TGF $\beta$ -induzierter Myofibrogenese gibt, und dass  $\beta$ -Catenin und der Wnt-Signalweg für die Pathogenese bedeutend sein könnten. Es stellt sich daher die Frage, ob die Bestrahlung von TGF $\beta$ -aktivierten Fibroblasten eine Inhibition der  $\beta$ -Catenin-Expression zur Folge hat, was zur  $\alpha$ -sma-Inhibition führen könnte. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich jedoch, dass weder in MD- noch CTS-Fibroblasten durch Bestrahlung eine Modulation der  $\beta$ -Catenin-Expression stattfindet. Daher lässt sich annehmen, dass die Inhibition der  $\alpha$ -sma-Expression durch Bestrahlung nicht durch  $\beta$ -Catenin-Inhibition vermittelt wird.

Nach 5 Tagen zeigt sich in MD-Fibroblasten durch die Bestrahlung mit blauem Licht ( $\lambda = 453$  nm) eine Induktion der NF $\kappa$ B-Expression (Abb. 24). In CTS-Fibroblasten ist nach 3 Tagen eine höhere Expression von NF $\kappa$ B in bestrahlten Fibroblasten ohne TGF $\beta$ -Aktivierung als in bestrahlten und TGF $\beta$ -aktivierten Fibroblasten nachweisbar (Abb. 22). Dass der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B durch ROS sowohl inhibiert als auch induziert wird, ist bereits bekannt (Siomek, 2012). So kann H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in T-Zellen (Schreck et al., 1991) und in Skelettmuskelzellen (Zhou et al., 2001) NF $\kappa$ B aktivieren. Da

durch Bestrahlung mit blauem Licht ROS entstehen (Taflinski et al., 2014, Mamalis et al., 2015, Opländer et al., 2011), könnte dies ein Grund für eine Induktion von NF $\kappa$ B-Expression durch Bestrahlung sein. Ungeklärt ist, warum bei Aktivierung mit TGF $\beta$ 1 diese Induktion durch Bestrahlung nicht stattfindet.

P53 ist beteiligt an der Induktion der Expression der Mn-SOD und GPX, während eine Überexpression der Katalase die p53 induzierte Apoptose verhindern kann (Hussain et al., 2004). Wie in 4.3 besprochen wird, zeigen die Mn-SOD- und Katalase-Expression in MD Auffälligkeiten. Daher könnte dieser Transkriptionsfaktor für die Signalwege in MD und die Vorgänge während Bestrahlung mit blauem Licht bedeutend sein. Die Betrachtung von p53 ist vielversprechend und sollte in zukünftige Untersuchungen einfließen.

### **4.3 Die Beeinflussung der Expression der ROS-modulierenden Enzyme durch Bestrahlung und SB-431542**

In dieser Arbeit konnte bereits die mögliche Bedeutung der ROS für den Bestrahlungseffekt hervorgehoben werden. Es bleibt jedoch die Frage, woher die unter Einfluss von blauem Licht entstehenden ROS und die ROS in MD stammen. Aus diesem Grund wurden verschiedene ROS-modulierende Enzyme hinsichtlich ihrer Expression untersucht.

Die NOX4-Expression wird durch TGF $\beta$ 1 nach 3 Tagen signifikant in CTS- und tendenziell in MD-Fibroblasten induziert (Abb. 31, 32). Nach 5-tägiger Behandlung ist diese Induktion jedoch nicht mehr vorhanden. Korrespondierend ist die Induktion der NOX4 durch TGF $\beta$  in glatten Muskelzellen der Atemwege bereits bekannt (Michaeloudes et al., 2011). Eventuell besteht nach 5 Tagen ein Gewöhnungseffekt, oder NOX4-Induktion ist nur in den ersten Tagen für die Myofibroblastendifferenzierung erforderlich. Es lässt sich jedoch annehmen, dass die Myofibrogenese zumindest in der Anfangsphase durch NOX4 moduliert wird, da eine Inhibition der NOX4 die TGF $\beta$ -induzierte Zunahme der  $\alpha$ -sma-Expression verhindert (Murphy-Marshman et al., 2017, Hecker et al., 2009). Die weitere Untersuchung der NOX4 war interessant, da die Bestrahlung mit blauem Licht einen ähnlichen Effekt hat wie die Inhibition der NOX4, nämlich die Inhibition der  $\alpha$ -sma-Expression. Die Frage war, ob die Bestrahlung mit blauem Licht die NOX4-Expression moduliert. Die Bestrahlung zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die NOX4, außer dass die NOX4-Induktion durch TGF $\beta$ 1 im CTS nach 3 Tagen bei gleichzeitiger Bestrahlung nicht signifikant und weniger deutlich ausfällt. Eine signifikante Inhibition der NOX4-Expression durch Bestrahlung findet jedoch nicht statt und scheint daher nicht der Grund für die Reduktion der  $\alpha$ -sma-Expression durch blaues Licht zu sein. Eine Induktion der NOX4 ist ebenfalls nicht nachweisbar und ist nicht die Quelle der ROS-Entstehung bei Bestrahlung. Obwohl die NOX4 für die Pathogenese des MD bedeutend erscheint, vermittelt die Bestrahlung mit blauem Licht ihren Effekt nicht primär über die NOX4.

Die Katalase-Expression wird vorherigen Arbeiten zufolge durch TGF $\beta$  in glatten Muskelzellen der Atemwege inhibiert (Michaeloudes et al., 2011). Auch in dieser Arbeit zeigt sich eine Inhibition der Katalase-Expression in MD-Fibroblasten durch TGF $\beta$  nach 3 Tagen (Abb. 26, 27). Dies könnte ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen erniedrigter Katalase-Expression, resultierend in vermehrten ROS, und Myofibrogenese sein.

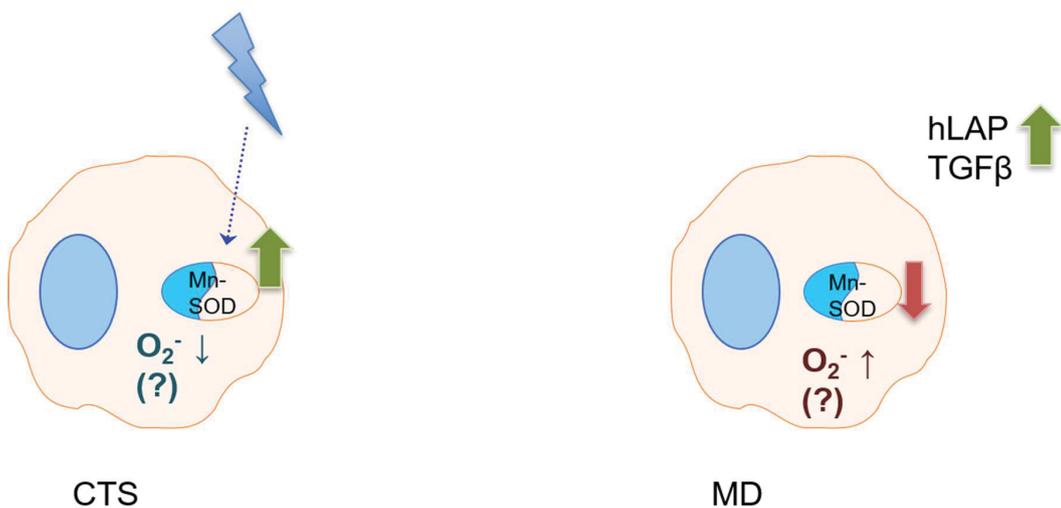
Blaues Licht inhibiert in *Monascus*, einem Schimmelpilz, die Katalase-Aktivität (Zhang et al., 2017), und UVA-Bestrahlung kann die Katalase inhibieren (Shindo und Hashimoto, 1997, Zigman et al., 1996). Es ist aber auch Aktivitätserhöhung in *Cerena unicolor* (ein saprobischer Pilz) durch blaues Licht (Pawlik et al., 2019) und Katalase-Induktion durch ROS (Zhou et al., 2001, Franco et al., 1999) bekannt. In der vorliegenden Arbeit moduliert die Bestrahlung in unbehandelten Fibroblasten nicht die Katalase-Expression. Nach 3 Tagen zeigt sich jedoch in mit TGF $\beta$ 1-aktivierten CTS- und MD-Fibroblasten eine Inhibition der Katalase-Expression durch Bestrahlung (Abb. 26, 27). Nach 5-tägiger Behandlung ist dieser Effekt nur noch bei MD und nur in der Gruppe der durch TGF $\beta$ -aktivierten und gleichzeitig bestrahlten Zellen zu finden (Abb. 29). Ohne zusätzliche Bestrahlung ist nach 5 Tagen weder in der Versuchsreihe mit SB-431542 noch in der Bestrahlungsversuchsreihe eine Inhibition durch TGF $\beta$  allein feststellbar. Dies deutet darauf hin, dass die Bestrahlung die TGF $\beta$ -vermittelte Inhibition der Katalase verstärkt. ROS, die wie bereits erwähnt die Myofibrogenese induzieren können, scheinen auch an der Vermittlung des Bestrahlungseffektes beteiligt zu sein. Da die Katalase-Expression durch Bestrahlung TGF $\beta$ -aktivierter Fibroblasten inhibiert wird, könnte es in MD-Fibroblasten zu einem bestrahlungsassoziierten Anstieg von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kommen. Es konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu durch TGF $\beta$ 1-aktivierten Zellen eine Hemmung der  $\alpha$ -sma-Induktion, als Marker der verstärkten Myofibroblastengengese, zur Folge hat. In fibrotischem Gewebe mit hohen internen TGF $\beta$ 1-Leveln, wie MD (Badalamente et al., 1996), wäre eine Vermittlung des Bestrahlungseffektes über eine Inhibition der Katalase-Expression mit weiterer Erhöhung von ROS denkbar. Die Katalase präsentiert sich also als möglicherweise maßgeblich für den Effekt der Bestrahlung mit blauem Licht verantwortlich.

Die Mn-SOD, ein weiteres ROS-modulierendes Enzym, zeigt nach 5 Tagen eine Inhibition der Expression durch TGF $\beta$ 1 in MD-, aber nicht CTS-Zellen (Abb. 42). Hierbei war es irrelevant, ob eine gleichzeitige Bestrahlung mit blauem Licht erfolgte oder nicht. Eine Inhibition der Mn-SOD durch TGF $\beta$  wurde bereits in glatten Muskelzellen der Atemwege beschrieben (Michaeloudes et al., 2011). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch Zugabe von SB-431542 zu einer Induktion der Mn-SOD-Expression in MD und CTS kommt (Abb. 52, 54). Dies könnte auf ein Unterbinden der Inhibition der Mn-SOD-Expression durch TGF $\beta$  zurückzuführen sein. Interessanterweise zeigt sich jedoch auch in der TGF $\beta$ -unbehandelten Gruppe eine Induktion der Mn-SOD-Expression durch SB (Abb. 52, 54). Möglicherweise ist hier eine Aufhebung inhibierender Effekte von endogenem TGF $\beta$  ursächlich. Von Interesse ist ebenfalls, dass SB zwar die Mn-SOD-

Expression induziert, jedoch die von  $\alpha$ -sma inhibiert – solch ein Effekt auf die Mn-SOD ist durch Bestrahlung nicht zu beobachten, obwohl diese  $\alpha$ -sma-Expression ebenso inhibiert. Durch eine Induktion der Mn-SOD durch SB könnte es zur Abnahme von  $O_2^-$ , jedoch folglich zu einer Zunahme von  $H_2O_2$  kommen, was ebenfalls die  $\alpha$ -sma-Expression inhibieren kann (Abb. 5-8). SB und Bestrahlung könnten demzufolge über verschiedene Mechanismen zu einer Erhöhung von  $H_2O_2$  führen und somit den Surrogatparameter für Myofibroblastengnese,  $\alpha$ -sma, inhibieren.

In CTS-Fibroblasten findet weiterhin durch Bestrahlung nach 3 und 5 Tagen eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Induktion der Mn-SOD-Expression statt (Abb. 40, 43). Es ist bereits bekannt, dass die Mn-SOD geringfügig durch oxidativen Stress in Fibroblasten (Strålin und Marklund, 1994) und in Adenocarcinomzellen durch  $H_2O_2$  (Warner et al., 1996) induziert werden kann. Da während der Bestrahlung ROS entstehen, könnte dies für die leichte Expressionssteigerung in den CTS-Fibroblasten verantwortlich sein. Der inhibierende Effekt von TGF $\beta$  ist durch die Bestrahlung jedoch nicht aufzuheben – dies könnte erklären, warum in den MD-Fibroblasten, die höhere TGF $\beta$ -Basis-Level zeigen (Badalamente et al., 1996, Krause et al., 2011), keine Induktion durch die Bestrahlung stattfindet.

In dieser Arbeit konnte eine erniedrigte Mn-SOD-Expression in MD-Fibroblasten im Vergleich mit CTS-Fibroblasten aufgezeigt werden (Abb. 37, 38). Die bereits beschriebenen erhöhten TGF $\beta$ -Level in MD könnten die hier nachgewiesene erniedrigte Mn-SOD-Expression im MD erklären. Dieser Expressionsunterschied zeigt sich tendenziell auch bei unbehandelten MD- und CTS-Fibroblasten, wird jedoch nur bei den bestrahlten Fibroblasten signifikant, da hier nur in CTS-Fibroblasten eine Induktion der Mn-SOD stattfindet. Eventuell würden die Expressionsunterschiede zwischen MD und CTS bei einer größeren Probandenzahl deutlicher. Mögliche Folgen sind in Abb. 56 verdeutlicht.



**Abb. 56: Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen MD und CTS** In CTS-Fibroblasten (links) konnten höhere Mn-SOD-Expressionslevel nachgewiesen werden als in MD-

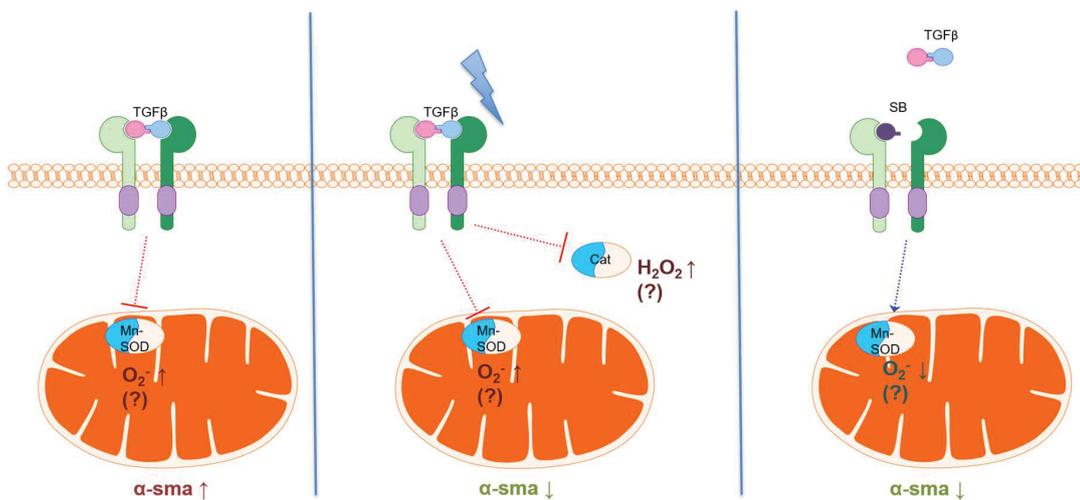
Fibroblasten (rechts), was zu erhöhter ROS-Belastung mit  $O_2^-$  in MD führen könnte. Die Mn-SOD zeigte sich weiterhin in CTS-Fibroblasten durch Bestrahlung (blauer Pfeil) mit blauem Licht induzierbar (nicht signifikant). In MD-Fibroblasten zeigt sich, als weiterer Unterschied, vermehrt TGF $\beta$  hLAP.

Insgesamt könnte die Erniedrigung der Mn-SOD-Expression eine mögliche Quelle für erhöhte ROS in Form von  $O_2^-$  im MD sein. Anfallendes  $O_2^-$  würde im CTS durch die Mn-SOD in das stabilere  $H_2O_2$  umgewandelt werden, den MD-Fibroblasten bliebe dieser Mechanismus jedoch gegebenenfalls verschlossen. Diese fehlende antioxidative Kapazität könnte für die Pathogenese von MD bedeutend sein und die Assoziation von MD und ROS erklären. Passend zu diesen Ergebnissen finden sich in MD mitochondriale Mutationen (Bayat et al., 2005), Wirkungsort der Mn-SOD. Auf eine wichtige Rolle der Mitochondrien während der Myofibroblastendifferenzierung deutet weiterhin hin, dass durch TGF $\beta$  die mitochondriale ROS-Produktion verstärkt wird (Jain et al., 2013). Weiterhin wurde bereits demonstriert, dass bei isolierter Bestrahlung der Mitochondrien ROS entstehen (Godley et al., 2005). In MD-Zellen könnte aufgrund der erniedrigten Mn-SOD-Expression die Kapazität fehlen, diese ROS zu verstoffwechseln, was zu einer ROS-Zunahme durch Bestrahlung führen würde. Mitochondrien sind daher für weitere Arbeiten bezüglich der ROS-Genese von Interesse.

SOD1 wird in CTS durch 3-tägige Bestrahlung induziert (Abb. 35). In der Literatur wird ebenfalls von einer unter anderem durch NF $\kappa$ B-modulierten SOD1-Induktion durch  $H_2O_2$  berichtet (Yoo et al., 1999, Rojo et al., 2004). Daher ist es möglich, das Bestrahlungs- bzw. ROS-induzierte NF $\kappa$ B-Expression einen steigernden Einfluss auf die SOD1-Expression in CTS hat. Gegensätzlich zu diesen Ergebnissen wird jedoch auch von fehlenden bis inhibierenden Effekten auf die SOD1 durch ROS berichtet (Strålin und Marklund, 1994). Es lassen sich keine eindeutigen Aussagen zu den Interaktionen zwischen ROS und SOD1 treffen.

Die GPX-Aktivität zeigt lediglich nach 5 Tagen in CTS-Fibroblasten eine Inhibition durch TGF $\beta$ -Behandlung und gleichzeitige Bestrahlung (Abb. 44). Dies widerspricht bisherigen Erkenntnissen, nach denen GPX-Aktivität durch  $H_2O_2$  und TGF $\beta$  in *Anulus fibrosus* Zellen von Ratten induziert wird (Ni et al., 2019). Die Autoren berichten jedoch auch, dass  $H_2O_2$  ohne TGF $\beta$  eine Erniedrigung der GPX-Aktivität hervorruft (Ni et al., 2019). In Skelettmuskelzellen scheint die GPX durch  $H_2O_2$  NF $\kappa$ B-moduliert induziert zu werden (Zhou et al., 2001, Franco et al., 1999). Eine Inhibition der GPX-Aktivität scheint daher ungewöhnlich, und eventuell greift ein anderer Mechanismus als ROS bei der Inhibition durch Bestrahlung und TGF $\beta$ .

Eine zusammenfassende Darstellung der Beeinflussung der ROS-modulierenden Proteine in MD findet sich in Abb. 57.



**Abb. 57: Schematische Darstellung der Behandlungseffekte in MD-Fibroblasten.** Die Behandlung mit TGF $\beta$  konnte eine Inhibition der Mn-SOD und Induktion von  $\alpha$ -sma hervorrufen (links). Dies hätte evtl. eine erhöhte Belastung mit ROS zur Folge, und könnte eine mögliche Quelle von ROS in MD sein. Bestrahlung TGF $\beta$ -behandelter Zellen mit blauem Licht für 5 Tage führte einerseits zur Inhibition von  $\alpha$ -sma und Mn-SOD-Expression, andererseits, und dies ebenso in CTS-Fibroblasten, zur Inhibition der Katalase (mittig). Dies könnte zu einer weiteren Genese von ROS führen und eine Quelle der bei Bestrahlung entstehenden ROS sein. Die Inhibition des TGF $\beta$  mittels SB hat eine Induktion der Mn-SOD und  $\alpha$ -sma-Inhibition in MD und CTS zur Folge (rechts). Dies deutet auf einen anderen Mechanismus der  $\alpha$ -sma-Inhibition als Bestrahlung hin, stützt aber die These, dass TGF $\beta$  die Mn-SOD-Expression inhibiert.

#### 4.4 Limitationen

Ein MD-Donor musste verworfen werden, da nach Infektion der Zelllinien und anschließender Behandlung mit Ciprofloxacin im Western Blot höhere Expressionslevel der Mn-SOD in MD- als in CTS-Fibroblasten festgestellt wurden, ein gegenläufiges Ergebnis zu den anderen Donoren. Tatsächlich ist aus anderen Arbeiten bekannt, dass die Mn-SOD durch  $H_2O_2$  in humanen pulmonalen Adenocarcinomzellen (Warner et al., 1996) oder durch Lipopolysaccharide, welche in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien enthalten sind, in pulmonalen epithelialen Zellen (Visner et al., 1990) induziert werden kann. Es ist daher zu vermuten, dass durch die Infektion eine Induktion stattgefunden haben könnte.

Ein weiterer möglicher limitierender Faktor ist, dass bis auf GPX keine Aktivitäts-, sondern primär eine Expressionsanalyse der Enzyme erfolgte. Enzymaktivität wird zu großen Teilen von Substrat- und Enzymmenge bestimmt, welche die Expression abbilden kann. Weitere Faktoren sind zum Beispiel pH und Temperatur (Vitolo, 2020). In dem verwendeten Versuchsaufbau gab es keine Hinweise auf pH-Veränderungen, die Temperatur wurde zwischen Kontrollen und behandelten Zellen konstant gehalten. Daher erscheint die Expressionsanalyse als Annäherung an die Aktivität ausreichend.

Einschränkend ist zu erwähnen, dass, aufgrund des häufigeren Auftretens von MD bei Männern, bei den Daten ein Geschlechtsbias besteht – von 19 MD-Patienten war nur 1 Spender weiblich. Bei den CTS-Spendern bestand ein solcher Bias mit 7 männlichen und 10 weiblichen Spendern nicht.

#### **4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick**

Es ist bereits bekannt, dass im MD mehr ROS vorhanden sind und die Bestrahlung den intrazellulären Anteil der ROS weiter erhöht. Es wurde vermutet, dass diese Erhöhung der ROS möglicherweise mit der Inhibition der  $\alpha$ -sma-Expression bei Bestrahlung zusammenhängt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von  $H_2O_2$  zu TGF $\beta$ -aktivierten MD-Fibroblasten eine Inhibition der  $\alpha$ -sma-Expression vermittelt werden kann. Dies spiegelt den bereits bekannten und hier erneut bestätigten Effekt der Bestrahlung mit blauem Licht. Dieser therapeutische Effekt des blauen Lichtes eröffnet Möglichkeiten des Einsatzes der Bestrahlung, zum Beispiel in der Rezidivprophylaxe des MD. Zusammenfassend wird durch die Inhibition der  $\alpha$ -sma-Expression durch  $H_2O_2$  die Vermutung untermauert, dass der Effekt der Blaulichtbestrahlung durch ROS vermittelt werden könnte. Aus diesem Grund erfolgte die Untersuchung von an der ROS-Homöostase beteiligten Enzymen.

Die NOX4, obwohl mit der TGF $\beta$ 1-induzierten  $\alpha$ -sma-Expression und damit Entwicklung von Fibrose assoziiert, wird durch die Bestrahlung nicht nennenswert beeinflusst. Interessanterweise zeigte die NOX4 nur in den 3 Tage behandelten CTS-Zellen eine Beeinflussung durch TGF $\beta$ , was auf eine kritische Rolle der NOX4, insbesondere für die Anfangsphase der Fibrosierung, hindeutet. Auch die Katalase-Expression in MD wird durch TGF $\beta$  nach 3 Tagen verändert: Es kommt in der Folge zu einer Inhibition, was eine weitere ROS-Erhöhung induziert. Es ist möglich, dass die Inhibition der Proteinexpression durch TGF $\beta$  für die zur Entwicklung von Fibrose führenden Vorgänge von Bedeutung ist. Eine potenzielle Quelle der im MD erhöhten Basislevel der ROS stellt die, vermutlich aufgrund des vermehrten Einflusses von TGF $\beta$ 1, in MD tendenziell erniedrigte Mn-SOD-Expression dar. Im Zusammenspiel mit weiteren Veränderungen in der ROS-Homöostase, unter anderem den bereits beschriebenen möglichen Veränderungen der NOX4- und Katalase-Expression, könnte diese herabgesetzte antioxidative Kapazität von MD-Zellen ein entscheidender Faktor in der Pathogenese der Erkrankung sein. Es ist hierbei hervorzuheben, dass durch eine erniedrigte Proteinexpression der Mn-SOD reaktives  $O_2^-$ , aber weniger stabiles  $H_2O_2$  anfallen würde.  $O_2^-$ -Radikale könnten daher für die fibrotischen Charakteristika der Erkrankung eine entscheidende Rolle spielen.

Die Inhibition der Katalase-Expression durch die Bestrahlung TGF $\beta$ -aktivierter MD-Fibroblasten könnte für die ROS-Entstehung durch Bestrahlung mit blauem Licht verantwortlich sein. Hierbei scheint es zu einer Verstärkung des inhibierenden Effektes von TGF $\beta$ 1 auf die Katalase-Expression durch die Bestrahlung zu kommen. Möglicherweise verändert sich durch eine längerfristige bestrahlungsassoziierte Inhibition der Katalase die ROS-Homöostase, wodurch  $\alpha$ -sma inhibiert wird.

Denkbar wäre eine Inhibition der  $\alpha$ -sma-Expression durch eine zunehmende Konzentration von  $H_2O_2$ , welches bei einer suffizienten Katalase-Expression besser verstoffwechselt würde.

Um diese Hypothesen zu testen, sind weitere Untersuchungen, wie das Zufügen der defizienten Enzyme Mn-SOD und/oder Katalase zu bestrahlten Zellen, nötig. Ein weiterer Ansatz ist die Untersuchung der Mitochondrien, Sitz der Mn-SOD, als weitere Quelle der ROS-Generation bei Bestrahlung.

In MD waren in dieser Arbeit höhere Level von TGF $\beta$  hLAP nachweisbar, welches möglicherweise durch in MD-Fibroblasten erhöhte ROS-Level vermehrt aktiviert wird. Es wurde weiterhin bestätigt, dass die Behandlung mit SB-431542 die  $\alpha$ -sma-Induktion verhindern kann. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit eine Induktion der Mn-SOD durch SB gezeigt werden, denkbar wäre hier ein Wegfallen der Mn-SOD-Inhibition durch endogenes TGF $\beta$ 1. Es kommt also zu einer Zunahme eines in MD eigentlich defizienten Enzyms, während die Katalase nicht beeinflusst wird. Durch die Mn-SOD-Induktion würde hypothetisch das  $H_2O_2$  zunehmen, was wiederum die  $\alpha$ -sma-Expression inhibieren könnte. Inwiefern die SB-Behandlung mit Blaulicht-Bestrahlung kombiniert werden könnte, ist Gegenstand weiterer Forschungsansätze.

Zusammenfassend werden als mögliche Quellen von ROS in MD eine erniedrigte Expression der Mn-SOD und bei Bestrahlung eine erniedrigte Expression der Katalase identifiziert. Weiterhin zeigt sich eine Assoziation von NOX4, Katalase,  $\beta$ -Catenin und Myofibroblasteninduktion. Diese Ergebnisse eröffnen neue Sichtweisen auf die Pathogenese und mögliche Therapie von MD. Denkbar wären zum Beispiel eine intraoperative oder postoperative Bestrahlung des Operationsgebietes zur Rezidivprophylaxe, oder regelmäßige Blaulichtbestrahlung zur Hemmung des Voranschreitens des Morbus Dupuytren. Auch die Behandlung mit SB, einem TGF $\beta$ -Rezeptor-Inhibitor, könnte in der klinischen Anwendung vielversprechend sein. Die Bestrahlung mit blauem Licht und/oder B-Behandlung könnten die operative Therapie, das Standbein der MD-Therapie, gegebenenfalls unterstützen und additiv eingesetzt werden. Da die Erkrankung mit einem starken Verlust an Lebensqualität einhergehen kann, sind weitere Untersuchungen im Bereich der Therapieoptionen nötig und von besonderem Interesse für die Betroffenen.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- AKHMETSHINA, A., PALUMBO, K., DEES, C., BERGMANN, C., VENALIS, P., ZERR, P., HORN, A., KIREVA, T., BEYER, C., ZWERINA, J., SCHNEIDER, H., SADOWSKI, A., RIENER, M.-O., MACDOUGALD, O. A., DISTLER, O., SCHETT, G. & DISTLER, J. H. W. 2012. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- $\beta$ -mediated fibrosis. *Nature Communications*, 3, 735.
- AMINI NIK, S., EBRAHIM, R. P., VAN DAM, K., CASSIMAN, J. J. & TEJPAN, S. 2007. TGF-beta modulates beta-Catenin stability and signaling in mesenchymal proliferations. *Exp Cell Res*, 313.
- AMUTHAN, G., BISWAS, G., ZHANG, S. Y., KLEIN-SZANTO, A., VIJAYASARATHY, C. & AVADHANI, N. 2001. Amuthan G, Biswas G, Zhang SY, Klein-Szanto A, Vijayasarathy C, Avadhani NG Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *EMBO J* 20: 1910-1920. *The EMBO journal*, 20, 1910-20.
- ANNES, J. P., CHEN, Y., MUNGER, J. S. & RIFKIN, D. B. 2004. Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *J Cell Biol*, 165, 723-34.
- ANNES, J. P., MUNGER, J. S. & RIFKIN, D. B. 2003. Making sense of latent TGF $\beta$  activation. *Journal of Cell Science*, 116, 217-224.
- ASANO, Y., IHN, H., YAMANE, K., JINNIN, M., MIMURA, Y. & TAMAKI, K. 2005. Involvement of  $\alpha$ V $\beta$ 5 integrin-mediated activation of latent transforming growth factor  $\beta$ 1 in autocrine transforming growth factor  $\beta$  signaling in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism*, 52, 2897-2905.
- ASANO, Y., IHN, H., YAMANE, K., JINNIN, M., MIMURA, Y. & TAMAKI, K. 2006. *Increased Expression of Integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 Contributes to the Establishment of Autocrine TGF- $\beta$  Signaling in Scleroderma Fibroblasts*.
- ATTALI, P., INK, O., PELLETIER, G., VERNIER, C., JEAN, F., MOULTON, L. & ETIENNE, J. P. 1987. Dupuytren's contracture, alcohol consumption, and chronic liver disease. *Arch Intern Med*, 147, 1065-7.
- BADALAMENTE, M. A., SAMPSON, S. P., HURST, L. C., DOWD, A. & MIYASAKA, K. 1996. The role of transforming growth factor beta in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am*, 21, 210-5.
- BARCELLOS-HOFF, M. H. & DIX, T. A. 1996. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol Endocrinol*, 10, 1077-83.
- BARNES, J. L. & GORIN, Y. 2011. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney international*, 79, 944-956.
- BAYAT, A., WALTER, J., LAMBE, H., WATSON, J. S., STANLEY, J. K., MARINO, M., FERGUSON, M. W. & OLLIER, W. E. 2005. Identification of a novel mitochondrial mutation in Dupuytren's disease using multiplex DHPLC. *Plast Reconstr Surg*, 115, 134-41.
- BECKER, D., LANGER, E., SEEMANN, M., SEEMANN, G., FELL, I., SALOGA, J., GRABBE, S. & STEBUT, E. 2011. Clinical Efficacy of Blue Light Full Body Irradiation as Treatment Option for Severe Atopic Dermatitis. *PloS one*, 6, e20566.
- BOCCHINO, M., AGNESE, S., FAGONE, E., SVEGLIATI, S., GRIECO, D., VANCHERI, C., GABRIELLI, A., SANDUZZI, A. & AVVEDIMENTO, E. V. 2010. Reactive oxygen species are required for maintenance and differentiation of primary lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *PloS one*, 5, e14003-e14003.
- BOECKER W., DENK H., HEITZ P. U., HÖFLER G., KREIPE H., MOCH H., 2012. Pathologie, 5., vollständig überarbeitete Auflage, Elsevier Urban&Fischer München, S. 60, S. 894, S. 904 f.
- BONDI, C. D., MANICKAM, N., LEE, D. Y., BLOCK, K., GORIN, Y., ABBOUD, H. E. & BARNES, J. L. 2010. NAD(P)H oxidase mediates TGF-beta1-induced activation of kidney myofibroblasts. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 21, 93-102.

- BONNIAUD, P., KOLB, M., GALT, T., ROBERTSON, J., ROBBINS, C., STAMPFLI, M., LAVERY, C., MARGETTS, P. J., ROBERTS, A. B. & GAULDIE, J. 2004. Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis. *J Immunol*, 173, 2099-108.
- BORGSCHEULZE, A., 2016. Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 auf die Differenzierung von Fibroblasten und zur Bedeutung von blauem Licht beim Morbus Dupuytren, Dissertation medizinische Fakultät der Heinrich Heine Universität
- BOUZEGHRANE, F., MERCURE, C., L REUDELHUBER, T. & THIBAUT, G. 2004. *Alpha8beta1 integrin is upregulated in myofibroblasts of fibrotic and scarring myocardium.*
- BOWER, M., NELSON, M. & GAZZARD, B. G. 1990. Dupuytren's contractures in patients infected with HIV. *BMJ (Clinical research ed.)*, 300, 164-165.
- BOWLEY, E., O'GORMAN, D. B. & GAN, B. S. 2007. Beta-catenin signaling in fibroproliferative disease. *J Surg Res*, 138.
- BRENNER, P., KRAUSE-BERGMANN, A. & VAN, V. H. 2001. [Dupuytren contracture in North Germany. Epidemiological study of 500 cases]. *Unfallchirurg*, 104, 303-11.
- BUNDESVEREINIGUNG, K. 2012. Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Arzneimittel-Richtlinie (AM-RL): Anlage XII – Beschlüsse über die Nutzenbewertung von Arzneimitteln mit neuen Wirkstoffen nach § 35a des Fünften Buches Sozialgesetzbuch (SGB V) – Mikrobielle Collagenase aus Clostridium histolyticum. *Dtsch Arztebl International*, 109, A-1842-A-1844.
- CALLAHAN, J. F., BURGESS, J. L., FORNWALD, J. A., GASTER, L. M., HARLING, J. D., HARRINGTON, F. P., HEER, J., KWON, C., LEHR, R., MATHUR, A., OLSON, B. A., WEINSTOCK, J. & LAPING, N. J. 2002. Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) type 1 receptor (ALK5). *J Med Chem*, 45, 999-1001.
- CARMONA-CUENCA, I., RONCERO, C., SANCHO, P., CAJA, L., FAUSTO, N., FERNÁNDEZ, M. & FABREGAT, I. 2008. Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-beta in hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity. *Journal of Hepatology*, 49, 965-976.
- CHAN, E. C., PESHAVARIYA, H. M., LIU, G. S., JIANG, F., LIM, S. Y. & DUSTING, G. J. 2013. Nox4 modulates collagen production stimulated by transforming growth factor beta1 in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 430, 918-25.
- CHEN, N. C., SRINIVASAN, R. C., SHAUVER, M. J. & CHUNG, K. C. 2011. A systematic review of outcomes of fasciotomy, aponeurotomy, and collagenase treatments for Dupuytren's contracture. *HAND*, 6, 250-255.
- CHEON, S. S., WEI, Q., GURUNG, A., YOUN, A., BRIGHT, T., POON, R., WHETSTONE, H., GUHA, A. & ALMAN, B. A. 2006. Beta-catenin regulates wound size and mediates the effect of TGF-beta in cutaneous healing. *Faseb J*, 20.
- CHRISTIE, W. S., PUHL, A. A. & LUCACIU, O. C. 2012. Cross-frictional therapy and stretching for the treatment of palmar adhesions due to Dupuytren's contracture: a prospective case study. *Man Ther*, 17, 479-82.
- CHRZANOWSKA-WODNICKA, M. & BURRIDGE, K. 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *The Journal of cell biology*, 133, 1403-1415.
- CLEVERS, H. & NUSSE, R. 2012. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Disease. *Cell*, 149, 1192-1205.
- CONSTANTINO, E. & DEUTINGER, M. 1996. Ergebnisse nach operativer Behandlung der Dupuytren'schen Kontraktur. *Acta Chirurgica Austriaca*, 28, 163-165.
- CRAWFORD, S. E., STELLMACH, V., MURPHY-ULLRICH, J. E., RIBEIRO, S. M., LAWLER, J., HYNES, R. O., BOIVIN, G. P. & BOUCK, N. 1998. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*, 93, 1159-1170.
- CUCORANU, I., CLEMPUS, R., DIKALOVA, A., PHELAN, P. J., ARIYAN, S., DIKALOV, S. & SORESCU, D. 2005. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res*, 97, 900-7.
- D. ARORA, P., NARANI, N. & A. G. MCCULLOCH, C. 1999. *The Compliance of Collagen Gels Regulates Transforming Growth Factor- $\beta$  Induction of  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin in Fibroblasts.*

- DARBY, I., SKALLI, O. & GABBIANI, G. 1990. *Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing.*
- DARBY, I. A., LAVERDET, B., BONTÉ, F. & DESMOULIÈRE, A. 2014. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 7, 301-311.
- DESMOULIÈRE, A., DARBY, I. A. & GABBIANI, G. 2003. Normal and Pathologic Soft Tissue Remodeling: Role of the Myofibroblast, with Special Emphasis on Liver and Kidney Fibrosis. *Laboratory Investigation*, 83, 1689-1707.
- DESMOULIERE, A., GEINOZ, A., GABBIANI, F. & GABBIANI, G. 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*, 122, 103-11.
- DUMONT C., TEZVAL M., BIRTH M., AMMON J., STÜRMER K. M., 2011. Morbus Dupuytren – Diagnose, OP-Indikation und chirurgische Therapie. *ZFA Zeitschrift für Allgemeinmedizin*. Ausgabe 06/2011, DOI: 10.3238/zfa.2011.0274.
- EATON, C. 2014. Evidence-based medicine: Dupuytren contracture. *Plast Reconstr Surg*, 133, 1241-51.
- FENG, X. H. & DERYNCK, R. 2005. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 659-93.
- FINKEL, T. & HOLBROOK, N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-47.
- FLANDERS, K. C. 2004. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *International Journal of Experimental Pathology*, 85, 47-64.
- FRANCO, A. A., ODOM, R. S. & RANDO, T. A. 1999. Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, 27, 1122-32.
- FREDERICK, J. E., SNELL, H. E. & HAYWOOD, E. K. 1989. SOLAR ULTRAVIOLET RADIATION AT THE EARTH'S SURFACE. *Photochemistry and Photobiology*, 50, 443-450.
- GABBIANI, G., RYAN, G. B. & MAJNE, G. 1971. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*, 27, 549-50.
- GILDA, J. E. & GOMES, A. V. 2013. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to  $\beta$ -actin for Western blots. *Analytical biochemistry*, 440, 186-188.
- GODLEY, B. F., SHAMSI, F. A., LIANG, F.-Q., JARRETT, S. G., DAVIES, S. & BOULTON, M. 2005. Blue Light Induces Mitochondrial DNA Damage and Free Radical Production in Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 21061-21066.
- GOLD, M., SENSING, W. & BIRON, J. 2011. Clinical efficacy of home-use blue-light therapy for mild-to moderate acne. *Journal of cosmetic and laser therapy : official publication of the European Society for Laser Dermatology*, 13, 308-14.
- GRAY, A. M. & MASON, A. J. 1990. Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science*, 247, 1328-30.
- GRAZINA, R., TEIXEIRA, S., RAMOS, R., SOUSA, H., FERREIRA, A. & LEMOS, R. 2019. Dupuytren's disease: where do we stand? *EFORT open reviews*, 4, 63-69.
- HACHMANN, J. P. & AMSHEY, J. W. 2005. Models of protein modification in Tris-glycine and neutral pH Bis-Tris gels during electrophoresis: Effect of gel pH. *Analytical Biochemistry*, 342, 237-245.
- HALLIDAY, N. L., RAYAN, G. M., ZARDI, L. & TOMASEK, J. J. 1994. Distribution of ED-A and ED-B containing fibronectin isoforms in dupuytren's disease. *The Journal of Hand Surgery*, 19, 428-434.
- HECKER, L., VITTAL, R., JONES, T., JAGIRDAR, R., LUCKHARDT, T. R., HOROWITZ, J. C., PENNATHUR, S., MARTINEZ, F. J. & THANNICKAL, V. J. 2009. NADPH Oxidase-4 Mediates Myofibroblast Activation and Fibrogenic Responses to Lung Injury. *Nature medicine*, 15, 1077-1081.
- HEINRICH P. C., MÜLLER M., GRAEVE L., 2014. Löffler/Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Auflage, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, S. 254 ff., S. 252-256. S. 889.
- HENRY, M. 2014. Dupuytren's disease: current state of the art. *Hand (N Y)*, 9, 1-8.

- HINDOCHA, S. 2018. Risk Factors, Disease Associations, and Dupuytren Diathesis. *Hand Clin*, 34, 307-314.
- HINZ, B., CELETTA, G., TOMASEK, J. J., GABBIANI, G. & CHAPONNIER, C. 2001. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Molecular biology of the cell*, 12, 2730-2741.
- HINZ, B. & GABBIANI, G. 2003. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost*, 90, 993-1002.
- HINZ, B., PHAN, S. H., THANNICKAL, V. J., GALLI, A., BOCHATON-PIALLAT, M.-L. & GABBIANI, G. 2007. The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American journal of pathology*, 170, 1807-1816.
- HINZ, B., PHAN, S. H., THANNICKAL, V. J., PRUNOTTO, M., DESMOULIÈRE, A., VARGA, J., DE WEVER, O., MAREEL, M. & GABBIANI, G. 2012. Recent Developments in Myofibroblast Biology: Paradigms for Connective Tissue Remodeling. *The American Journal of Pathology*, 180, 1340-1355.
- HOVIUS, S. E., KAN, H. J., SMIT, X., SELLES, R. W., CARDOSO, E. & KHOURI, R. K. 2011. Extensive percutaneous aponeurotomy and lipografting: a new treatment for Dupuytren disease. *Plast Reconstr Surg*, 128, 221-8.
- HOVIUS, S. E., KAN, H. J., VERHOEKX, J. S. & KHOURI, R. K. 2015. Percutaneous Aponeurotomy and Lipofilling (PALF): A Regenerative Approach to Dupuytren Contracture. *Clin Plast Surg*, 42, 375-81, ix.
- HOWARD, J. C., VARALLO, V. M., ROSS, D. C., ROTH, J. H., FABER, K. J., ALMAN, B. & GAN, B. S. 2003. Elevated levels of beta-catenin and fibronectin in three-dimensional collagen cultures of Dupuytren's disease cells are regulated by tension in vitro. *BMC Musculoskelet Disord*, 4.
- HU, F. Z., NYSTROM, A., AHMED, A., PALMQUIST, M., DOPICO, R., MOSSBERG, I., GLADITZ, J., RAYNER, M., POST, J. C., EHRlich, G. D. & PRESTON, R. A. 2005. Mapping of an autosomal dominant gene for Dupuytren's contracture to chromosome 16q in a Swedish family. *Clin Genet*, 68, 424-9.
- HUESTON, J. T. 1962. Further studies on the incidence of Dupuytren's contracture. *Med J Aust*, 49(1), 586-8.
- HUSSAIN, S. P., AMSTAD, P., HE, P., ROBLES, A., LUPOLD, S., KANEKO, I., ICHIMIYA, M., SENGUPTA, S., MECHANIC, L., OKAMURA, S., HOFSETH, L. J., MOAKE, M., NAGASHIMA, M., FORRESTER, K. S. & HARRIS, C. C. 2004. p53-Induced Up-Regulation of MnSOD and GPx but not Catalase Increases Oxidative Stress and Apoptosis. *Cancer Research*, 64, 2350.
- INMAN, G. J., NICOLAS, F. J., CALLAHAN, J. F., HARLING, J. D., GASTER, L. M., REITH, A. D., LAPING, N. J. & HILL, C. S. 2002. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol*, 62, 65-74.
- JAIN, M., RIVERA, S., MONCLUS, E. A., SYNENKI, L., ZIRK, A., EISENBART, J., FEGHALI-BOSTWICK, C., MUTLU, G. M., BUDINGER, G. R. & CHANDEL, N. S. 2013. Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*, 288, 770-7.
- JIANG, F., LIU, G.-S., DUSTING, G. & CHAN, E. 2014a. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- $\beta$ -mediated fibrotic responses.
- JIANG, F., LIU, G.-S., DUSTING, G. J. & CHAN, E. C. 2014b. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- $\beta$ -mediated fibrotic responses. *Redox Biology*, 2, 267-272.
- JOBLING, M. F., MOTT, J. D., FINNEGAN, M. T., JURUKOVSKI, V., ERICKSON, A. C., WALIAN, P. J., TAYLOR, S. E., LEDBETTER, S., LAWRENCE, C. M., RIFKIN, D. B. & BARCELLOS-HOFF, M. H. 2006. Isoform-specific activation of latent transforming growth factor beta (LTGF-beta) by reactive oxygen species. *Radiat Res*, 166, 839-48.
- KADHUM, M., SMOCK, E., KHAN, A. & FLEMING, A. 2017. Radiotherapy in Dupuytren's disease: a systematic review of the evidence. *J Hand Surg Eur Vol*, 42, 689-692.
- KAIRISALO, M., KORHONEN, L., BLOMGREN, K. & LINDHOLM, D. 2007. X-linked inhibitor of apoptosis protein increases mitochondrial antioxidants through NF- $\kappa$ B activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364, 138-144.

- KLOEN, P. 1999. New insights in the development of Dupuytren's contracture: a review. *Br J Plast Surg*, 52, 629-35.
- KOHAN, M., MURO, A. F., WHITE, E. S. & BERKMAN, N. 2010. EDA-containing cellular fibronectin induces fibroblast differentiation through binding to  $\alpha 4\beta 7$  integrin receptor and MAPK/Erk 1/2-dependent signaling. *The FASEB Journal*, 24, 4503-4512.
- KOLI, K., HYYTIAINEN, M., RYYNANEN, M. J. & KESKI-OJA, J. 2005. Sequential deposition of latent TGF-beta binding proteins (LTBPs) during formation of the extracellular matrix in human lung fibroblasts. *Exp Cell Res*, 310, 370-82.
- KOLODNEY, M. & ELSON, E. 1993. Correlation of myosin light chain phosphorylation with isometric contraction of fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, 268, 23850-5.
- KOPP, J., SEYHAN, H., MÜLLER, B., LANCZAK, J., PAUSCH, E., GRESSNER, A. M., DOOLEY, S. & HORCH, R. E. 2006. N-Acetyl-L-Cysteine abrogates fibrogenic properties of fibroblasts isolated from Dupuytren's disease by blunting TGF- $\beta$  signalling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10, 157-165.
- KRASOVKA, J., 2017. Molekulare Grundlagen der durch blaues Licht induzierten Differenzierungshemmung humaner Fibroblasten zu Myofibroblasten. Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich Heine Universität
- KRASOVKA, J., BORGSCHULZE, A., SAHLENDER, B., LÖGTERS, T., WINDOLF, J. & GROTHEER, V. 2019. Blue light irradiation and its beneficial effect on Dupuytren's fibroblasts. *PloS one*, 14, e0209833-e0209833.
- KRAUSE, C., KLOEN, P. & TEN DIJKE, P. 2011. Elevated transforming growth factor  $\beta$  and mitogen-activated protein kinase pathways mediate fibrotic traits of Dupuytren's disease fibroblasts. *Fibrogenesis & tissue repair*, 4, 14-14.
- KRSTIĆ, J., TRIVANOVIĆ, D., MOJSILOVIĆ, S. & SANTIBANEZ, J. F. 2015. Transforming Growth Factor-Beta and Oxidative Stress Interplay: Implications in Tumorigenesis and Cancer Progression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 654594.
- KUBICZKOVA, L., SEDLARIKOVA, L., HAJEK, R. & SEVCIKOVA, S. 2012. TGF- $\beta$  – an excellent servant but a bad master. *Journal of Translational Medicine*, 10, 183-183.
- KWAK, H.-B., LEE, Y., KIM, J.-H., VAN REMMEN, H., RICHARDSON, A. G. & LAWLER, J. M. 2015. MnSOD overexpression reduces fibrosis and pro-apoptotic signaling in the aging mouse heart. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 70, 533-544.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- LANTING, R., BROEKSTRA, D. C., WERKER, P. M. & VAN DEN HEUVEL, E. R. 2014. A systematic review and meta-analysis on the prevalence of Dupuytren disease in the general population of Western countries. *Plast Reconstr Surg*, 133, 593-603.
- LAPING, N. J., GRYGIELKO, E., MATHUR, A., BUTTER, S., BOMBERGER, J., TWEED, C., MARTIN, W., FORNWALD, J., LEHR, R., HARLING, J., GASTER, L., CALLAHAN, J. F. & OLSON, B. A. 2002. Inhibition of Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta 1$ -Induced Extracellular Matrix with a Novel Inhibitor of the TGF- $\beta$  Type I Receptor Kinase Activity: SB-431542. *Molecular Pharmacology*, 62, 58.
- LARKIN, J. G. & FRIER, B. M. 1986. Limited joint mobility and Dupuytren's contracture in diabetic, hypertensive, and normal populations. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 292, 1494-1494.
- LAROCERIE-SALGADO, J. & DAVIDSON, J. 2012. Nonoperative treatment of PIPJ flexion contractures associated with Dupuytren's disease. *J Hand Surg Eur Vol*, 37, 722-7.
- LEAFBLAD, N. D., WAGNER, E., WANDERMAN, N. R., ANDERSON, G. R., VISSCHER, S. L., MARADIT KREMERS, H., LARSON, D. R. & RIZZO, M. 2019. Outcomes and Direct Costs of Needle Aponeurotomy, Collagenase Injection, and Fasciectomy in the Treatment of Dupuytren Contracture. *J Hand Surg Am*, 44, 919-927.
- LEASK, A. & ABRAHAM, D. J. 2004. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb j*, 18, 816-27.
- LI, B. & WANG, J. H. C. 2011. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. *Journal of tissue viability*, 20, 108-120.

- LIEBMANN, J., BORN, M. & KOLB-BACHOFEN, V. 2010. Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. *J Invest Dermatol*, 130, 259-69.
- LIU, R.-M. & DESAI, L. P. 2015. Reciprocal regulation of TGF- $\beta$  and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. *Redox Biology*, 6, 565-577.
- LOEW, O. 1900. A NEW ENZYME OF GENERAL OCCURRENCE IN ORGANISMIS. *Science*, 11, 701.
- LU, M., MUNGER, J., STEADELE, M., BUSALD, C., TELLIER, M. & M SCHNAPP, L. 2003. *Integrin alpha8beta1 mediates adhesion to LAP-TGFbeta1*.
- LUDBROOK, S. B., BARRY, S. T., DELVES, C. J. & HORGAN, C. M. T. 2003. The integrin alphavbeta3 is a receptor for the latency-associated peptides of transforming growth factors beta1 and beta3. *The Biochemical journal*, 369, 311-318.
- MAHMOUD, B. H., HEXSEL, C. L., HAMZAVI, I. H. & LIM, H. W. 2008. Effects of Visible Light on the Skin†. *Photochemistry and Photobiology*, 84, 450-462.
- MAJNO, G., GABBIANI, G., HIRSCHL, B. J., RYAN, G. B. & STATKOV, P. R. 1971. Contraction of Granulation Tissue in vitro: Similarity to Smooth Muscle. *Science*, 173, 548-550.
- MAMALIS, A., GARCHA, M. & JAGDEO, J. 2015. Light Emitting Diode-Generated Blue Light Modulates Fibrosis Characteristics: Fibroblast Proliferation, Migration Speed, and Reactive Oxygen Species Generation. *Lasers in surgery and medicine*, 47, 210-215.
- MAMALIS, A., KOO, E. & JAGDEO, J. 2016. Resveratrol Prevents Reactive Oxygen Species-Induced Effects of Light-Emitting Diode-Generated Blue Light in Human Skin Fibroblasts. *Dermatologic Surgery*, 42, 727-732.
- MANGASSER-STEPHAN, K., GARTUNG, C., LAHME, B. & GRESSNER, A. M. 2001. Expression of isoforms and splice variants of the latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) in cultured human liver myofibroblasts. *Liver*, 21, 105-13.
- MARTYN, K. D., FREDERICK, L. M., VON LOEHNEISEN, K., DINAUER, M. C. & KNAUS, U. G. 2006. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal*, 18, 69-82.
- MASSAGUE, J., SEOANE, J. & WOTTON, D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev*, 19, 2783-810.
- MATTYASOVSKY, S. G., WOLLSTÄDTER, J., MARTIN, A., RITZ, U., BARANOWSKI, A., OSSENDORF, C., ROMMENS, P. M. & HOFMANN, A. 2016. Inhibition of Contractile Function in Human Joint Capsule Myofibroblasts by Targeting the TGF- $\beta$ 1 and PDGF Pathways. *PLoS one*, 11, e0145948-e0145948.
- MCANULTY, R. J. 2007. Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 666-671.
- MEISTER, P., WILHELM, K. & ROCKL, C. 1978. [Palmar fibromatosis (morbus Dupuytren). Comparative clinical, pathological and anatomical mass examinations (author's transl)]. *MMW Munch Med Wochenschr*, 120, 93-8.
- MICHAELOUDES, C., SUKKAR, M. B., KHORASANI, N. M., BHAVSAR, P. K. & CHUNG, K. F. 2011. TGF- $\beta$  regulates Nox4, MnSOD and catalase expression, and IL-6 release in airway smooth muscle cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 300, L295-L304.
- MILLS, G. C. 1957. HEMOGLOBIN CATABOLISM: I. GLUTATHIONE PEROXIDASE, AN ERYTHROCYTE ENZYME WHICH PROTECTS HEMOGLOBIN FROM OXIDATIVE BREAKDOWN. *Journal of Biological Chemistry*, 229, 189-197.
- MISRA, S., FU, A. A., MISRA, K. D., SHERGILL, U. M., LEOF, E. B. & MUKHOPADHYAY, D. 2010. Hypoxia-induced phenotypic switch of fibroblasts to myofibroblasts through a matrix metalloproteinase 2/tissue inhibitor of metalloproteinase-mediated pathway: implications for venous neointimal hyperplasia in hemodialysis access. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR*, 21, 896-902.
- MIYAZONO, K., HELLMAN, U., WERNSTEDT, C. & HELDIN, C. H. 1988. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem*, 263, 6407-15.
- MUNGER, J. S., HUANG, X., KAWAKATSU, H., GRIFFITHS, M. J., DALTON, S. L., WU, J., PITTET, J. F., KAMINSKI, N., GARAT, C., MATTHAY, M. A., RIFKIN, D. B. &

- SHEPPARD, D. 1999. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*, 96, 319-328.
- MURLEY, J. S., KATAOKA, Y., HALLAHAN, D. E., ROBERTS, J. C. & GRDINA, D. J. 2001. Activation of NFκB and MnSOD gene expression by free radical scavengers in human microvascular endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 30, 1426-1439.
- MURPHY-MARSHMAN, H., QUENSEL, K., SHIWEN, X., BARNFIELD, R., KELLY, J., PEIDL, A., STRATTON, R. & LEASK, A. 2017. *Antioxidants and NOX1/NOX4 inhibition blocks TGFβ1-induced CCN2 and α-SMA expression in dermal and gingival fibroblasts.*
- MURRELL, G. A., FRANCIS, M. J. & BROMLEY, L. 1987. Free radicals and Dupuytren's contracture. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 295, 1373-5.
- MURRELL, G. A., FRANCIS, M. J. & BROMLEY, L. 1990. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochemical Journal*, 265, 659-665.
- MURRELL, G. A., FRANCIS, M. J. & BROMLEY, L. 1991. The collagen changes of Dupuytren's contracture. *J Hand Surg Br*, 16, 263-6.
- NI, B., SHEN, H., WANG, W., LU, H. & JIANG, L. 2019. TGF-β1 reduces the oxidative stress-induced autophagy and apoptosis in rat annulus fibrosus cells through the ERK signaling pathway. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 14, 241.
- NICULA, V., DECEA, N. & CIUCE, C. 2014. The Role of Oxidative Stress in Dupuytren's Disease Pathogenesis. *Clujul Medical; Vol 85, No 2 (2012).*
- OKUNO, T. 2008. Hazards of solar blue light. *Applied Optics*, 47, 2988-2992.
- OPLÄNDER, C., HIDDING, S., WERNERS, F. B., BORN, M., PALLUA, N. & SUSCHEK, C. V. 2011. Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 103, 118-125.
- PATTISON, D. & DAVIES, M. 2006. Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS*, 96, 131-57.
- PAWLIK, A., JASZEK, M., SULEJ, J. & JANUSZ, G. 2019. Light-regulated synthesis of extra- and intracellular enzymes related to wood degradation by the white rot fungus *Cerrena unicolor* during solid-state fermentation on ash sawdust-based medium. *Acta Biochim Pol.*
- PFÄFF, S., LIEBMANN, J., BORN, M., MERK, H. F. & VON FELBERT, V. 2015. Prospective Randomized Long-Term Study on the Efficacy and Safety of UV-Free Blue Light for Treating Mild Psoriasis Vulgaris. *Dermatology*, 231, 24-34.
- PIAS, E. K., EKSHYYAN, O. Y., RHOADS, C. A., FUSELER, J., HARRISON, L. & AW, T. Y. 2003. Differential Effects of Superoxide Dismutase Isoform Expression on Hydroperoxide-induced Apoptosis in PC-12 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 13294-13301.
- REELFS, O., TYRRELL, R. M. & POURZAND, C. 2004. Ultraviolet A Radiation-Induced Immediate Iron Release Is a Key Modulator of the Activation of NF-κB in Human Skin Fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, 122, 1440-1447.
- RICHTER, K. & KIETZMANN, T. 2016. *Reactive oxygen species and fibrosis: further evidence of a significant liaison.*
- RIEDL, C. R., PLAS, E., VORAUER, K., VCELAR, B., WAGNER, A. & PFLÜGER, H. 2001. Pilot study on liposomal recombinant human superoxide dismutase for the treatment of Peyronie's disease. *Eur Urol*, 40, 343-8; discussion 348-9.
- RIEDL, C. R., STERNIG, P., GALLÉ, G., LANGMANN, F., VCELAR, B., VORAUER, K., WAGNER, A., KATINGER, H. & PFLÜGER, H. 2005. Liposomal Recombinant Human Superoxide Dismutase for the Treatment of Peyronie's Disease: A Randomized Placebo-Controlled Double-Blind Prospective Clinical Study. *European Urology*, 48, 656-661.
- ROBERTS, A. B., ANZANO, M. A., WAKEFIELD, L. M., ROCHE, N. S., STERN, D. F. & SPORN, M. B. 1985. Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 119-123.
- ROBERTS, A. B., SPORN, M. B., ASSOIAN, R. K., SMITH, J. M., ROCHE, N. S., WAKEFIELD, L. M., HEINE, U. I., LIOTTA, L. A., FALANGA, V., KEHRL, J. H. & ET AL. 1986. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 4167-71.

- ROJO, A. I., SALINAS, M., MARTÍN, D., PERONA, R. & CUADRADO, A. 2004. Regulation of Cu/Zn-Superoxide Dismutase Expression via the Phosphatidylinositol 3 Kinase/Akt Pathway and Nuclear Factor- $\kappa$ B. *The Journal of Neuroscience*, 24, 7324.
- S CHEON, S., WEI, Q., GURUNG, A., YOUN, A., BRIGHT, T., POON, R., WHETSTONE, H., GUHA, A. & ALMAN, B. 2006. Cheon SS, Wei Q, Gurung A, Youn A, Bright T, Poon R, Whetstone H, Guha A, Alman B. *Beta-catenin regulates wound size and mediates the effect of TGF-beta in cutaneous healing. FASEB J* 20: 692-701.
- SANJUAN-CERVERO, R. 2019. Current role of the collagenase Clostridium histolyticum in Dupuytren's disease treatment. *Ir J Med Sci*.
- SCHRECK, R., RIEBER, P. & BAEUERLE, P. A. 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *The EMBO journal*, 10, 2247-2258.
- SEA, K., SOHN, S. H., DURAZO, A., SHENG, Y., SHAW, B. F., CAO, X., TAYLOR, A. B., WHITSON, L. J., HOLLOWAY, S. P., HART, P. J., CABELLI, D. E., GRALLA, E. B. & VALENTINE, J. S. 2015. Insights into the role of the unusual disulfide bond in copper-zinc superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry*, 290, 2405-2418.
- SERINI, G., BOCHATON-PIALLAT, M.-L., ROPRAZ, P., GEINOZ, A., BORSI, L., ZARDI, L. & GABBIANI, G. 1998. The Fibronectin Domain ED-A Is Crucial for Myofibroblastic Phenotype Induction by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1. *The Journal of Cell Biology*, 142, 873-881.
- SEßLER, C. 2017. SB431542 – selektiver Inhibitor der TGF $\beta$ 1-abhängigen profibrotischen Proteinexpression - Eine molekularbiologische Studie an Dupuytren'schen Fibroblasten.
- SHAW, R. B. J., CHONG, A. K. S., ZHANG, A., HENTZ, V. R. & CHANG, J. 2007. Dupuytren's Disease: History, Diagnosis, and Treatment. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 120, 44e-54e.
- SHI, Y. & MASSAGUÉ, J. 2003. Mechanisms of TGF- $\beta$  Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell*, 113, 685-700.
- SHINDE, A. V., HUMERES, C. & FRANGOGIANNIS, N. G. 2017. The role of  $\alpha$ -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1863, 298-309.
- SHINDE, A. V., KELSH, R., PETERS, J. H., SEKIGUCHI, K., VAN DE WATER, L. & MCKEOWN-LONGO, P. J. 2015. The  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrin and the EDA domain of fibronectin regulate a profibrotic phenotype in dermal fibroblasts. *Matrix Biology*, 41, 26-35.
- SHINDO, Y. & HASHIMOTO, T. 1997. Time course of changes in antioxidant enzymes in human skin fibroblasts after UVA irradiation. *Journal of Dermatological Science*, 14, 225-232.
- SIOMEK, A. 2012. NF-kappaB signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochim Pol*, 59, 323-31.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. & KLENK, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85.
- STRÅLIN, P. & MARKLUND, S. L. 1994. Effects of oxidative stress on expression of extracellular superoxide dismutase, CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase in human dermal fibroblasts. *Biochemical Journal*, 298, 347-352.
- SUN, Q., GUO, S., WANG, C. C., SUN, X., WANG, D., XU, N., JIN, S. F. & LI, K. Z. 2015. Cross-talk between TGF-beta/Smad pathway and Wnt/beta-catenin pathway in pathological scar formation. *Int J Clin Exp Pathol*, 8, 7631-9.
- SVOBODOVA, A., WALTEROVA, D. & VOSTALOVA, J. 2006. ULTRAVIOLET LIGHT INDUCED ALTERATION TO THE SKIN. *Biomedical papers*, 150, 25-38.
- TAFILINSKI, L., DEMIR, E., KAUCZOK, J., FUCHS, P. C., BORN, M., SUSCHEK, C. V. & OPLÄNDER, C. 2014. Blue light inhibits transforming growth factor- $\beta$ 1-induced myofibroblast differentiation of human dermal fibroblasts. *Experimental Dermatology*, 23, 240-246.
- TAIPALE, J., MIYAZONO, K., HELDIN, C. H. & KESKI-OJA, J. 1994. Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. *The Journal of cell biology*, 124, 171-181.

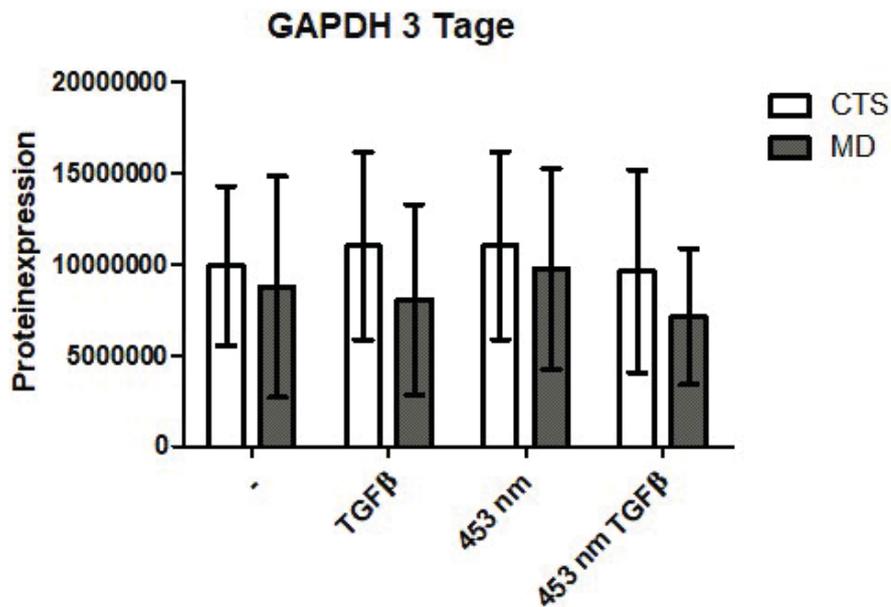
- TAKAC, I., SCHRÖDER, K., ZHANG, L., LARDY, B., ANILKUMAR, N., LAMBETH, J. D., SHAH, A. M., MOREL, F. & BRANDES, R. P. 2011. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *The Journal of biological chemistry*, 286, 13304-13313.
- TEN DAM, E.-J. P. M., VAN BEUGE, M. M., BANK, R. A. & WERKER, P. M. N. 2016. Further evidence of the involvement of the Wnt signaling pathway in Dupuytren's disease. *Journal of cell communication and signaling*, 10, 33-40.
- THOMAS, G. J., HART, I. R., SPEIGHT, P. M. & MARSHALL, J. F. 2002. Binding of TGF-beta1 latency-associated peptide (LAP) to alpha(v)beta6 integrin modulates behaviour of squamous carcinoma cells. *British journal of cancer*, 87, 859-867.
- TOLEDANO, M. B. & LEONARD, W. J. 1991. Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 4328-4332.
- TOMASEK, J. J., GABBIANI, G., HINZ, B., CHAPONNIER, C. & BROWN, R. A. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 349.
- TSUKAZAKI, T., CHIANG, T. A., DAVISON, A. F., ATTISANO, L. & WRANA, J. L. 1998. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell*, 95, 779-91.
- TUBIANA, R. 1986. Evaluation of deformities in Dupuytren's disease. *Ann Chir Main*, 5, 5-11.
- TUBIANA, R., MICHON, J. & THOMINE, J. M. 1968. Scheme for the assessment of deformities in Dupuytren's disease. *Surg Clin North Am*, 48, 979-84.
- TUCKER, R. F., SHIPLEY, G. D., MOSES, H. L. & HOLLEY, R. W. 1984. Growth Inhibitor from BSC-1 Cells Closely Related to Platelet Type  $\beta$  Transforming Growth Factor. *Science*, 226, 705-707.
- VAN BEECK, A., VAN DEN BROEK, M., MICHIELSEN, M., DIDDEN, K., VUYLSTEKE, K. & VERSTREKEN, F. 2017. Efficacy and safety of collagenase treatment for Dupuytren's disease: 2-year follow-up results. *Hand Surg Rehabil*, 36, 346-349.
- VAN RAAMSDONK, J. M. & HEKIMI, S. 2009. Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics*, 5, e1000361-e1000361.
- VAN RIJSEN, A. L., TER LINDEN, H. & WERKER, P. M. N. 2012. Five-Year Results of a Randomized Clinical Trial on Treatment in Dupuytren's Disease: Percutaneous Needle Fasciotomy versus Limited Fasciectomy. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 129, 469-477.
- VARALLO, V. M., GAN, B. S., SENEY, S., ROSS, D. C., ROTH, J. H., RICHARDS, R. S., MCFARLANE, R. M., ALMAN, B. & HOWARD, J. C. 2003a. Beta-catenin expression in Dupuytren's disease: potential role for cell-matrix interactions in modulating beta-catenin levels in vivo and in vitro. *Oncogene*, 22, 3680-4.
- VARALLO, V. M., GAN, B. S., SENEY, S., ROSS, D. C., ROTH, J. H., RICHARDS, R. S., MCFARLANE, R. M., ALMAN, B. & HOWARD, J. C. 2003b. Beta-catenin expression in Dupuytren's disease: potential role for cell-matrix interactions in modulating beta-catenin levels in vivo and in vitro. *Oncogene*, 22.
- VAUGHAN, M. B., HOWARD, E. W. & TOMASEK, J. J. 2000. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Promotes the Morphological and Functional Differentiation of the Myofibroblast. *Experimental Cell Research* 5V 257, 180-189.
- VILE, G. F., TANNEW-ILITSCHER, A. & TYRRELL, R. M. 1995. Activation of NF-kappa B in human skin fibroblasts by the oxidative stress generated by UVA radiation. *Photochem Photobiol*, 62, 463-8.
- VISNER, G. A., DOUGALL, W. C., WILSON, J. M., BURR, I. A. & NICK, H. S. 1990. Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J Biol Chem*, 265, 2856-64.
- VITOLO, M. 2020. BRIEF REVIEW ON ENZYME ACTIVITY. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 9, 60.
- VOLANTI, C., MATROULE, J.-Y. & PIETTE, J. 2002. Involvement of Oxidative Stress in NF- $\kappa$ B Activation in Endothelial Cells Treated by Photodynamic Therapy. *Photochemistry and photobiology*, 75, 36-45.

- VON ZGLINICKI, T., SARETZKI, G., DOCKE, W. & LOTZE, C. 1995. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res*, 220, 186-93.
- WANG, B., OMAR, A., ANGELOVSKA, T., DROBIC, V., RATTAN, S. G., JONES, S. C. & DIXON, I. M. C. 2007. Regulation of collagen synthesis by inhibitory Smad7 in cardiac myofibroblasts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 293, H1282-H1290.
- WARNER, B. B., STUART, L., GEBB, S. & WISPE, J. R. 1996. Redox regulation of manganese superoxide dismutase. *Am J Physiol*, 271, L150-8.
- WELSCH U., KUMMER W., DELLER T., 2018. Histologie das Lehrbuch, 5. Auflage, Elsevier Urban&Fischer München, S. 117 f., S. 170.
- WHEELAND, R. G. & KORECK, A. 2012. Safety and Effectiveness of a New Blue Light Device for the Self-treatment of Mild-to-moderate Acne. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 5, 25-31.
- WILKES, M., MITCHELL, H., GULATI PENHEITER, S., DORÉ, J., SUZUKI, K., EDENS, M., SHARMA, D., E PAGANO, R. & B LEOF, E. 2005. *Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2.*
- WRANA, J. L., ATTISANO, L., WIESER, R., VENTURA, F. & MASSAGUE, J. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, 370, 341-7.
- XU, L., CUI, W. H., ZHOU, W. C., LI, D. L., LI, L. C., ZHAO, P., MO, X. T., ZHANG, Z. & GAO, J. 2017. Activation of Wnt/beta-catenin signalling is required for TGF-beta/Smad2/3 signalling during myofibroblast proliferation. *J Cell Mol Med*, 21, 1545-1554.
- YAN, X., LIU, Z. & CHEN, Y. 2009. Regulation of TGF- $\beta$  signaling by Smad7. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 41, 263-272.
- YOO, H. Y., CHANG, M. S. & RHO, H. M. 1999. The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. *J Biol Chem*, 274, 23887-92.
- ZHANG, X., LIU, W., CHEN, X., CAI, J., WANG, C. & HE, W. 2017. Effects and Mechanism of Blue Light on Monascus in Liquid Fermentation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22, 385.
- ZHOU, L. Z., JOHNSON, A. P. & RANDO, T. A. 2001. NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med*, 31, 1405-16.
- ZIGMAN, S., REDDAN, J., SCHULTZ, J. B. & MCDANIEL, T. 1996. Structural and functional changes in catalase induced by near-UV radiation. *Photochem Photobiol*, 63, 818-24.

## 6 Anhang

### 6.1 Anhang I: Methodische Vorversuche zur Ladekontrolle

GAPDH und Totalprotein als Ladekontrolle, Vergleiche 3 Tage, n=7

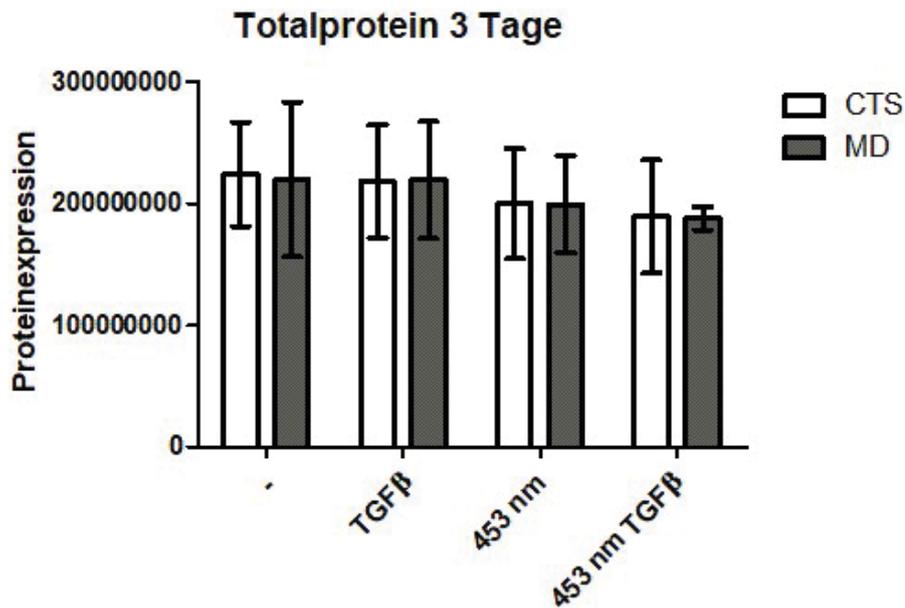


Graph: Western Blot GAPDH 3 Tage, n = 7

Mit *Adjusted Volume* der Rhodamin-Bande (GAPDH)

GAPDH 3 Tage	CTS	MD
-	9896150,000 +/- 4731907,000	8760243,000 +/- 6556662,000
TGFβ	1,100938e+007 +/- 5550731,000	8069933,000 +/- 5645114,000
453 nm	1,101229e+007 +/- 5557489,000	9748946,000 +/- 5964316,000
453 nm + TGFβ	9604872,000 +/- 6005419,000	7141982,000 +/- 4018004,000

Mittelwerte: Western Blot GAPDH 3 Tage, n = 7



Graph: Western Blot Totalprotein 3 Tage, n = 7

Mit Adjusted total lane Volume Totalprotein des Gels

GAPDH 3 Tage	CTS	MD
-	2,239986e+008 +/-4,619769e+007	2,197307e+008 +/-6,874456e+007
TGFβ	2,179722e+008 +/-4,994685e+007	2,192119e+008 +/-5,188479e+007
453 nm	1,997166e+008 +/-4,891971e+007	1,992235e+008 +/-4,334760e+007
453 nm + TGFβ	1,892293e+008 +/-5,010542e+007	1,875906e+008 +/-1,027271e+007

Mittelwerte: Western Blot Totalprotein 3 Tage, n = 7

## 6.2 Anhang II: Spenderliste

Spender, Geschlecht, Passage, Name	Alter	Gewebe	ROS-Protein Bestimmung Western Blot	SB-Versuch Western Blot	GPX-Assay	FACS	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Versuch
Spender P09/10, m, p3	60	MD	WB 1			x	
Spender P15, w, p4	38	CTS	WB 1				
Spender P07, m, p5	50	MD	WB 2				
Spender P04, w, p4	58	CTS	WB 2				
Spender P17, m, p4	68	MD	WB 3				
Spender P16, m, p4	59	CTS	WB 3				

Spender, Geschlecht, Passage, Name	Alter	Gewebe	ROS-Protein Bestimmung Western Blot	SB-Versuch Western Blot	GPX-Assay	FACS	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Versuch
Spender P14/13, m, p3	62	MD	WB 4			x	x
Spender P22, m, p4	68	CTS	WB 4			x	
Spender P23, m, p4	78	CTS	WB 5			x	
Spender P24, m, p4	82	MD	WB 5				
Spender P19, w, p4	78	CTS	WB 6			x	
Spender P21, m, p3	57	MD	WB 6			x	x
Spender P25, m, p4	79	CTS	WB 7				
Spender P20, m, p4	77	MD	WB 7			x	x
Spender P36, w, p4	44	CTS	WB 8, verworfen wegen Kontamination MD-Spender	SB 11, verworfen wegen Fehler im Blot	x als Spender P52, w, p4	x	
Spender P27, m, p5	51	MD	WB 8, verworfen wegen Kontamination	SB 1 und SB 1n		x (zu wenig Zellen, verworfen)	
Spender P42, w, p5, Re-OP P15	39	CTS	WB 9	SB 13	x	x	
Spender P26, m, p4	54	MD	WB 9			x	
Spender P38, w, p4	59	CTS		SB 10 verworfen wegen Fehler im Blot	x als Spender P57, w, p5		
Spender P28, m, p4	50	MD		SB 2 und SB 2n		x	
Spender P41, m, p3	56	MD		SB 12	x	x	
Spender P43, w, p6	86	CTS		SB 15	x	x	
Spender P44, m, p5	52	MD			x		
Spender P45, m, p6	65	MD		SB 16	x		
Spender P46, w, p3	55	CTS		SB 18	x	x	
Spender P47, w, p3	56	MD		SB 17	x	x	

Spender, Geschlecht, Passage, Name	Alter	Gewebe	ROS-Protein Bestimmung Western Blot	SB-Versuch Western Blot	GPX-Assay	FACS	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Versuch
Spender P48, m, p4	60	MD			x		
Spender P49, m, p4	67	MD			x		
Spender P50, m, p4	54	CTS		SB 19	x		
Spender P51, w, p4	56	CTS		SB 20	x		
Spender P53, m, p4	51	CTS			x		
Spender P54, w, p5	58	CTS			x		
Spender P56, m, p4	78	MD			x		
Spender P58, m, p5	73	MD			x		
Spender P59, m, p2	73	MD			x		
Spender P01, m, p5	61	CTS				x	

*Spenderliste*

Western Blot ROS		Gesamt	MD	CTS
	Gesamaltersdurchschnitt WB	63	64	62
	Durchschnittsalter Frauen	53	/	53
	Durchschnittsalter Männer	66	64	71
	Männer	12	8	4
	Frauen	4	0	4
FACS		Gesamt	MD	CTS
	Gesamaltersdurchschnitt FACS	61	59	64
	Durchschnittsalter Frauen	60	56	60
	Durchschnittsalter Männer	62	59	69
	Männer	10	7	3
	Frauen	6	1	5
SB-Versuch		Gesamt	MD	CTS
	Gesamaltersdurchschnitt SB	57	56	58
	Durchschnittsalter Frauen	58	56	59
	Durchschnittsalter Männer	55	56	54
	Männer	5	4	1
	Frauen	5	1	4
GPX		Gesamt	MD	CTS
	Gesamaltersdurchschnitt GPX	60	64	56
	Durchschnittsalter Frauen	57	56	57
	Durchschnittsalter Männer	63	66	53
	Männer	10	8	2
	Frauen	8	1	7

H2O2		Gesamt	MD	CTS
	Gesamaltersdurchschnitt H2O2	65	65	/
	Durchschnittsalter Frauen	/	/	/
	Durchschnittsalter Männer	65	65	/
	Männer	3	3	0
	Frauen	0	0	0
Alles		Gesamt	MD	CTS
	Gesamaltersdurchschnitt	61	63	60
	Durchschnittsalter Frauen	57	56	57
	Durchschnittsalter Männer	63	63	64
	Männer	25	18	7
	Frauen	11	1	10

*Statistik zur Spenderliste*

### 6.3 Anhang III: Ergebnisse – Daten und grafische Darstellung

#### 6.3.1 IIIa: Beeinflussung der $\alpha$ -sma-Expression durch Bestrahlung

$\alpha$ -sma 3 Tage	MD
-	1 +/- 0
TGF $\beta$	3,642 +/- 1,863
453 nm	1,257 +/- 0,6672
453 nm + TGF $\beta$	1,714 +/- 1,066

$\alpha$ -sma 3 Tage MD, normiert auf Kontrolle (-)

$\alpha$ -sma 3 Tage	CTS
-	1 +/- 0
TGF $\beta$	6,968931 +/- 7,224336
453 nm	1,072303 +/- 0,2996025
453 nm + TGF $\beta$	3,673807 +/- 3,248897

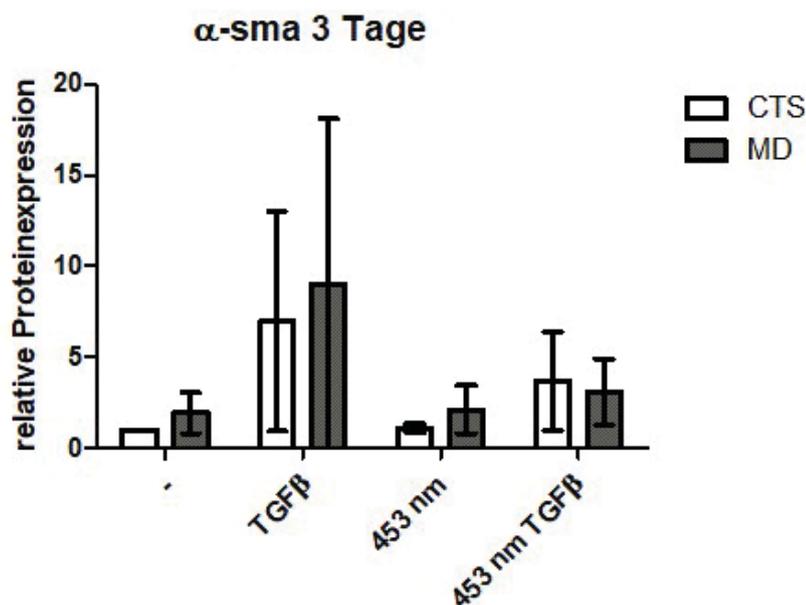
$\alpha$ -sma 3 Tage CTS, normiert auf Kontrolle (-)

$\alpha$ -sma 5 Tage	MD
-	1 +/- 0
TGF $\beta$	4,901 +/- 3,080
453 nm	0,9888 +/- 0,3247
453 nm + TGF $\beta$	2,475 +/- 0,8886

$\alpha$ -sma 5 Tage MD, normiert auf Kontrolle (-)

$\alpha$ -sma 5 Tage	CTS
-	1 +/- 0
TGF $\beta$	8,866041 +/- 9,769476
453 nm	1,427303 +/- 0,5919631
453 nm + TGF $\beta$	4,264876 +/- 3,521762

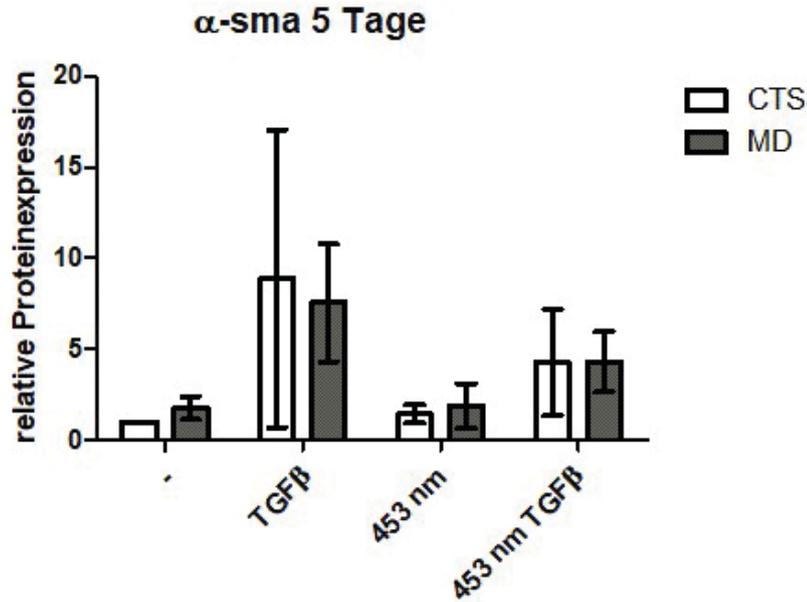
$\alpha$ -sma 5 Tage CTS, normiert auf Kontrolle (-)



Western Blot Bestrahlungsversuch  $\alpha$ -sma 3 Tage CTS vs MD, (n = 8)

$\alpha$ -sma 3 Tage	CTS	MD
-	1 +/- 0	1,926247 +/- 1,360063
TGF $\beta$	6,968931 +/- 7,224336	9,021366 +/- 10,86801
453 nm	1,072303 +/- 0,2996025	2,1147 +/- 1,557666
453 nm + TGF $\beta$	3,673807 +/- 3,248897	3,093674 +/- 2,179058

$\alpha$ -sma 3 Tage CTS vs MD, normiert auf Kontrolle CTS (-CTS)

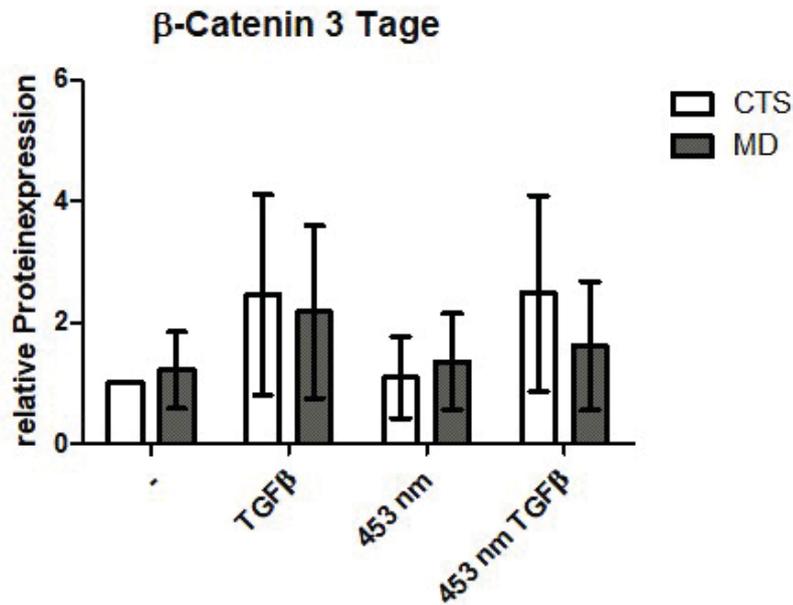


Western Blot Bestrahlungsversuch  $\alpha$ -sma 5 Tage CTS vs MD, (n = 8)

$\alpha$ -sma 5 Tage	CTS	MD
-	1 +/- 0	1,761108 +/- 0,7512057
TGF $\beta$	8,866041 +/- 9,769476	7,550002 +/- 3,88006
453 nm	1,427303 +/- 0,5919631	1,869602 +/- 1,479684
453 nm + TGF $\beta$	4,264876 +/- 3,521762	4,301405 +/- 1,976418

$\alpha$ -sma 5 Tage CTS vs MD, normiert auf Kontrolle CTS (-CTS)

### 6.3.2 IIIb: Beeinflussung der $\beta$ -Catenin-Expression durch Bestrahlung



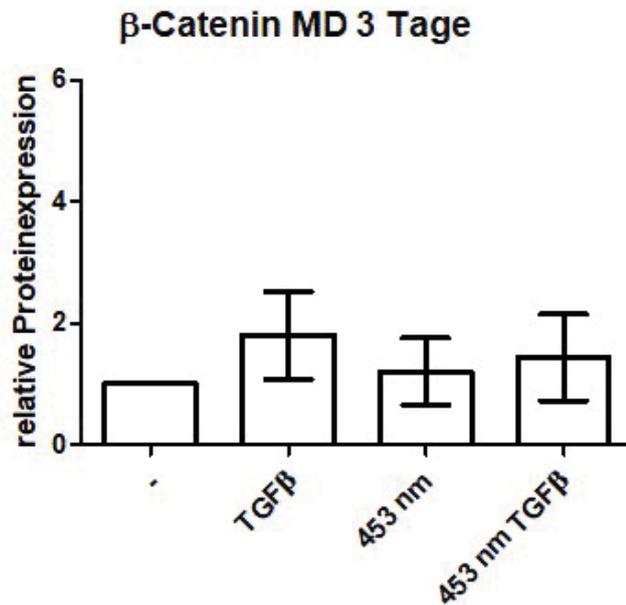
Western Blot Bestrahlungsversuch  $\beta$ -Catenin 3 Tage CTS vs MD, (n = 8)

$\beta$ -Catenin 3 Tage	CTS	MD
-	1 +/- 0	1,21625 +/- 0,7577775
TGF $\beta$	2,45375 +/- 1,977068	2,170 +/- 1,700034
453 nm	1,0925 +/- 0,7984225	1,3475 +/- 0,9479866
453 nm + TGF $\beta$	2,47875 +/- 1,931013	1,61125 +/- 1,272685

$\beta$ -Catenin 3 Tage CTS vs MD, normiert auf Kontrolle CTS (-CTS)

$\beta$ -Catenin 5 Tage	CTS	MD
-	1 +/- 0	1,502928 +/- 0,4467068
TGF $\beta$	2,412223 +/- 0,7900776	2,839944 +/- 1,087485
453 nm	1,490672 +/- 0,630074	1,98665 +/- 1,054477
453 nm + TGF $\beta$	3,049503 +/- 2,963876	2,517374 +/- 0,9239223

$\beta$ -Catenin 5 Tage CTS vs MD, normiert auf Kontrolle CTS (-CTS)



Western Blot Bestrahlungsversuch β-Catenin 3 Tage MD, (n = 8)

β-Catenin 3 Tage	MD
-	1 +/- 0
TGFβ	1,804 +/- 0,8657
453 nm	1,201 +/- 0,6610
453 nm + TGFβ	1,436 +/- 0,8515

β-Catenin 3 Tage MD, normiert auf Kontrolle (-)

β-Catenin 3 Tage	CTS
-	1 +/- 0
TGFβ	2,45375 +/- 1,977068
453 nm	1,0925 +/- 0,7984225
453 nm + TGFβ	2,47875 +/- 1,931013

β-Catenin 3 Tage CTS, normiert auf Kontrolle (-)

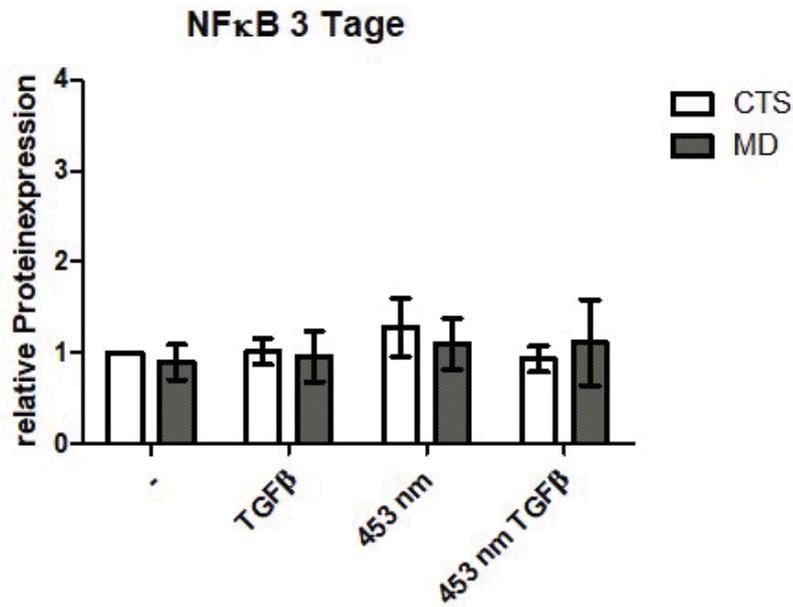
β-Catenin 5 Tage	MD
-	1 +/- 0
TGFβ	1,956 +/- 0,7580
453 nm	1,325 +/- 0,6764
453 nm + TGFβ	1,735 +/- 0,6517

β-Catenin 5 Tage MD, normiert auf Kontrolle (-)

β-Catenin 5 Tage	CTS
-	1 +/- 0
TGFβ	2,412223 +/- 0,7900776
453 nm	1,490672 +/- 0,630074
453 nm + TGFβ	3,049503 +/- 2,963876

β-Catenin 5 Tage CTS, normiert auf Kontrolle (-)

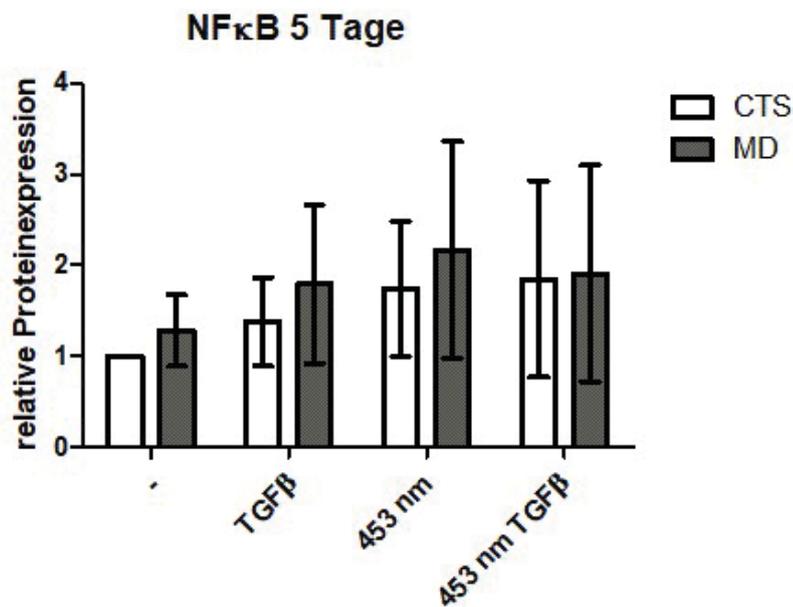
### 6.3.3 IIIc: Beeinflussung der NFκB-Expression durch Bestrahlung



Western Blot Bestrahlungsversuch NFκB 3 Tage CTS vs MD, (n = 8)

NFκB 3 Tage	CTS	MD
-	1 +/- 0	0,8970835 +/- 0,2329826
TGFβ	1,012607 +/- 0,1735317	0,9605037 +/- 0,3332561
453 nm	1,27875 +/- 0,3809176	1,097156 +/- 0,3388958
453 nm + TGFβ	0,9275 +/- 0,170021	1,114518 +/- 0,5646232

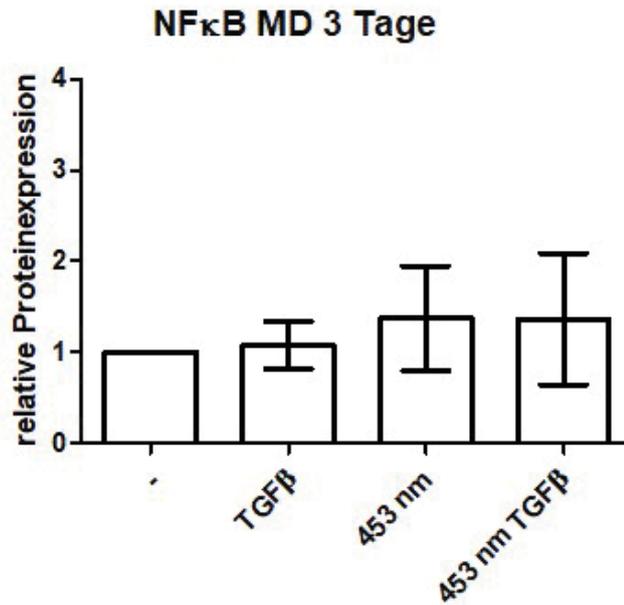
NFκB 3 Tage CTS vs MD, normiert auf Kontrolle CTS (-CTS)



Western Blot Bestrahlungsversuch NFκB 5 Tage CTS vs MD, (n = 8)

NFκB 5 Tage	CTS	MD
-	1 +/- 0	1,281647 +/- 0,4693092
TGFβ	1,378109 +/- 0,5841079	1,791402 +/- 1,040214
453 nm	1,742903 +/- 0,8849676	2,169817 +/- 1,423374
453 nm + TGFβ	1,849124 +/- 1,295693	1,909273 +/- 1,422371

NFκB 5 Tage CTS vs MD, normiert auf Kontrolle CTS (-CTS)



Western Blot Bestrahlungsversuch NFκB 3 Tage MD, (n = 8)

NFκB 3 Tage	MD
-	1 +/- 0
TGFβ	1,076 +/- 0,3173
453 nm	1,371 +/- 0,6916
453 nm + TGFβ	1,365 +/- 0,8646

NFκB 3 Tage MD, normiert auf Kontrolle (-)

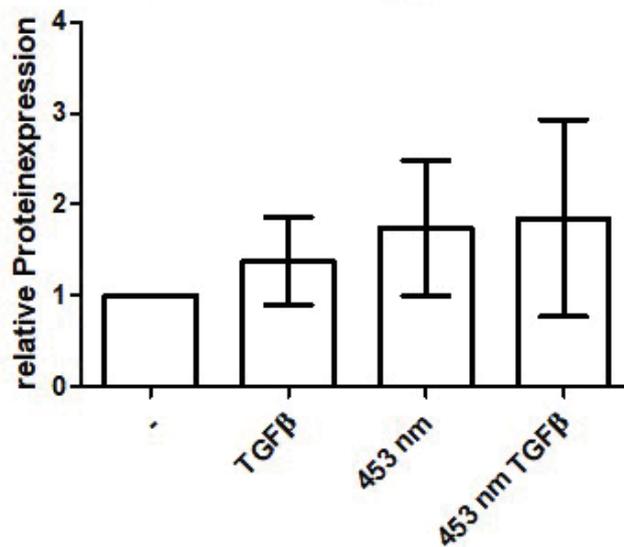
NFκB 3 Tage	CTS
-	1 +/- 0
TGFβ	1,012607 +/- 0,1735317
453 nm	1,27875 +/- 0,3809176
453 nm + TGFβ	0,9275 +/- 0,170021

NFκB 3 Tage CTS, normiert auf Kontrolle (-)

NFκB 5 Tage	MD
-	1 +/- 0
TGFβ	1,463 +/- 0,6768
453 nm	1,760 +/- 0,9786
453 nm + TGFβ	1,511 +/- 0,7498

NFκB 5 Tage MD, normiert auf Kontrolle (-)

### NFκB CTS 5 Tage



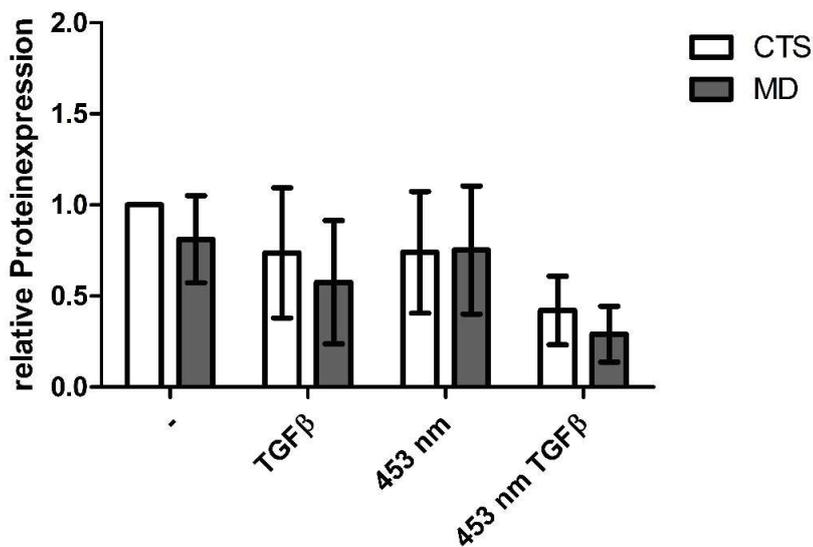
Western Blot Bestrahlungsversuch NFκB 5 Tage CTS, (n = 8)

NFκB 5 Tage	CTS
-	1 +/- 0
TGFβ	1,378109 +/- 0,5841079
453 nm	1,742903 +/- 0,8849676
453 nm + TGFβ	1,849124 +/- 1,295693

NFκB 5 Tage CTS, normiert auf Kontrolle (-)

#### 6.3.4 IIIId: Beeinflussung der Katalase-Expression durch Bestrahlung

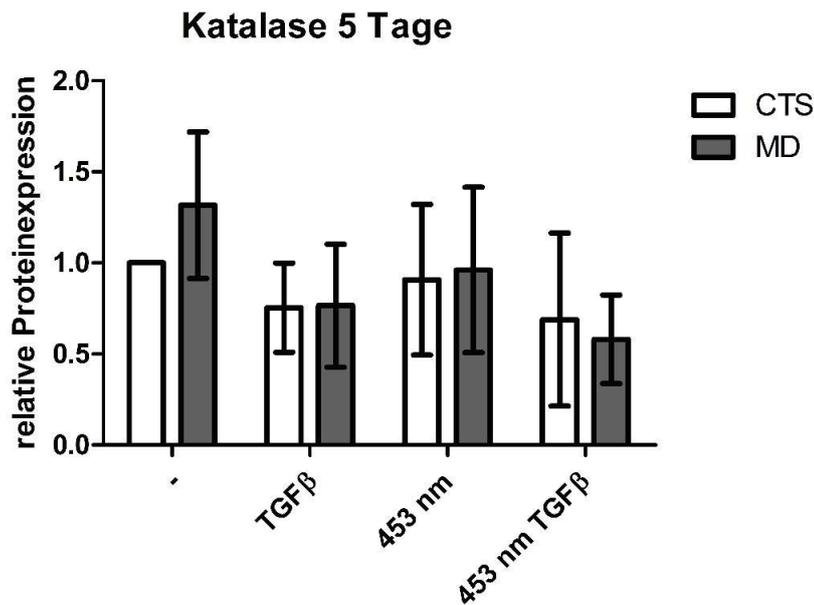
### Katalase 3 Tage



Western Blot Bestrahlungsversuch Katalase 3 Tage CTS vs MD, (n = 8)

Katalase 3 Tage	CTS	MD
-	1 +/- 0	0,8113692 +/- 0,2858999
TGFβ	0,7367744 +/- 0,4269846	0,5759821 +/- 0,4043705
453 nm	0,7401994 +/- 0,3996208	0,752951 +/- 0,4203486
453 nm + TGFβ	0,4216004 +/- 0,2252513	0,2908926 +/- 0,1831104

Katalase 3 Tage CTS vs MD, normiert auf Kontrolle CTS (-CTS)



Western Blot Bestrahlungsversuch Katalase 5 Tage CTS vs MD, (n = 8)

Katalase 5 Tage	CTS	MD
-	1 +/- 0	1,317023 +/- 0,4817986
TGFβ	0,7541945 +/- 0,2926515	0,7653831 +/- 0,4036504
453 nm	0,907337 +/- 0,4936498	0,9614219 +/- 0,542744
453 nm + TGFβ	0,6892682 +/- 0,5675131	0,5809259 +/- 0,2916734

Katalase 5 Tage CTS vs MD, normiert auf Kontrolle CTS (-CTS)

Katalase 3 Tage	MD
-	1 +/- 0
TGFβ	0,6802 +/- 0,3077
453 nm	0,8933 +/- 0,3152
453 nm + TGFβ	0,3338 +/- 0,1619

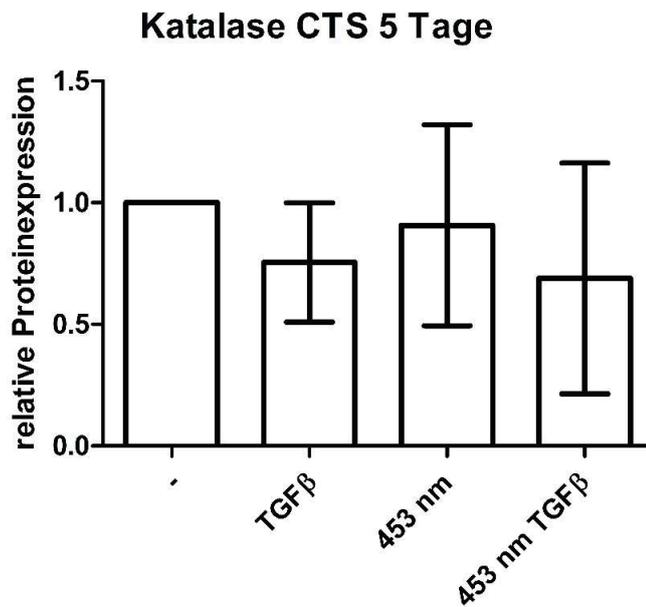
Katalase 3 Tage MD, normiert auf Kontrolle (-)

Katalase 3 Tage	CTS
-	1 +/- 0
TGFβ	0,7367744 +/- 0,4269846
453 nm	0,7401994 +/- 0,3996208
453 nm + TGFβ	0,4216004 +/- 0,2252513

Katalase 3 Tage CTS, normiert auf Kontrolle (-)

Katalase 5 Tage	MD
-	1 +/- 0
TGFβ	0,6374 +/- 0,3807
453 nm	0,7811 +/- 0,4986
453 nm + TGFβ	0,4557 +/- 0,2320

*Katalase 5 Tage MD, normiert auf Kontrolle (-)*

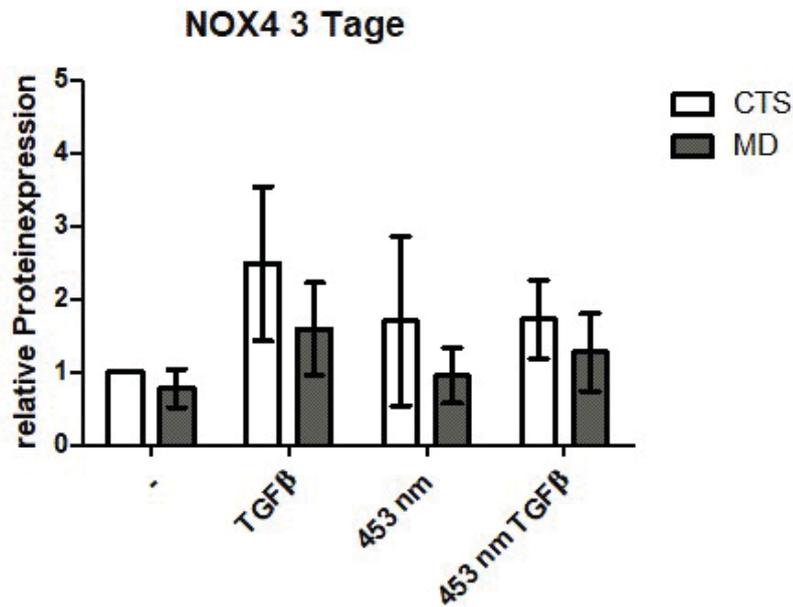


*Western Blot Bestrahlungsversuch Katalase 5 Tage CTS, (n = 8)*

Katalase 5 Tage	CTS
-	1 +/- 0
TGFβ	0,7541945 +/- 0,2926515
453 nm	0,907337 +/- 0,4936498
453 nm + TGFβ	0,6892682 +/- 0,5675131

*Katalase 5 Tage CTS, normiert auf Kontrolle (-)*

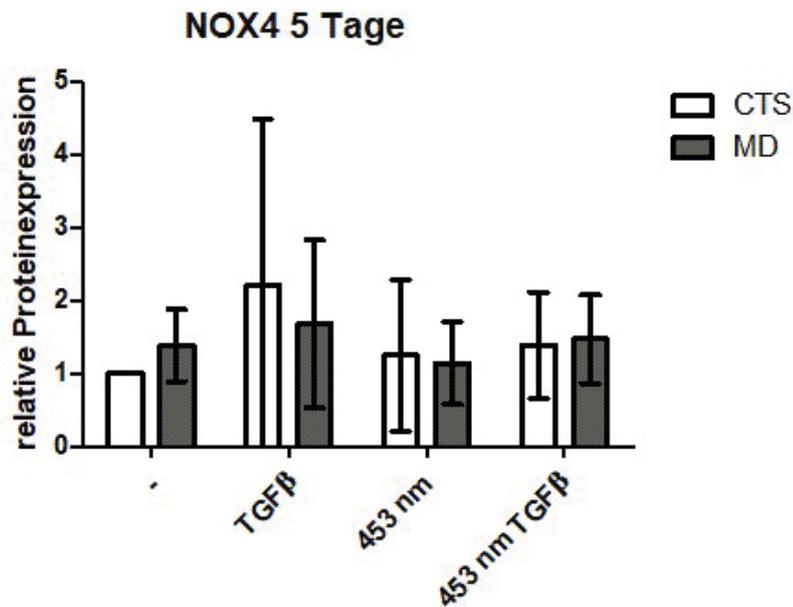
### 6.3.5 IIIe: Beeinflussung der NOX4-Expression durch Bestrahlung



Western Blot Bestrahlungsversuch NOX4 3 Tage CTS vs MD, (n = 8)

NOX4 3 Tage	CTS	MD
-	1 +/- 0	0,7771847 +/- 0,3119079
TGFβ	2,484617 +/- 1,25948	1,591267 +/- 0,7564692
453 nm	1,701021 +/- 1,381895	0,9524446 +/- 0,455864
453 nm + TGFβ	1,721957 +/- 0,6406016	1,272498 +/- 0,6318485

NOX4 3 Tage CTS vs MD, normiert auf Kontrolle CTS (-CTS)



Western Blot Bestrahlungsversuch NOX4 5 Tage CTS vs MD, (n = 8)

NOX4 5 Tage	CTS	MD
-	1 +/- 0	1,387181 +/- 0,5932037
TGFβ	2,207053 +/- 2,728287	1,679642 +/- 1,3755
453 nm	1,245934 +/- 1,250086	1,143065 +/- 0,6763219
453 nm + TGFβ	1,388747 +/- 0,8716684	1,471376 +/- 0,7216583

NOX4 5 Tage CTS vs MD, normiert auf Kontrolle CTS (-CTS)

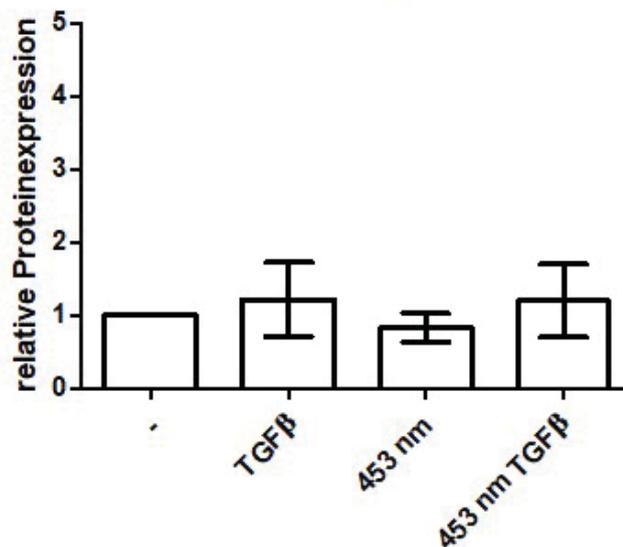
NOX4 3 Tage	MD
-	1 +/- 0
TGFβ	2,056 +/- 0,6884
453 nm	1,295 +/- 0,5462
453 nm + TGFβ	2,112 +/- 1,552

NOX4 3 Tage MD, normiert auf Kontrolle (-)

NOX4 3 Tage	CTS
-	1 +/- 0
TGFβ	2,484617 +/- 1,25948
453 nm	1,701021 +/- 1,381895
453 nm + TGFβ	1,721957 +/- 0,6406016

NOX4 3 Tage CTS, normiert auf Kontrolle (-)

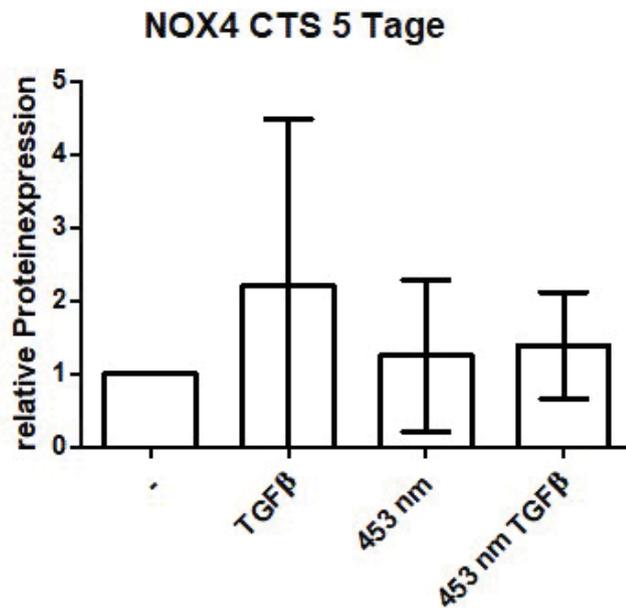
### NOX4 MD 5 Tage



Western Blot Bestrahlungsversuch NOX4 5 Tage MD, (n = 8)

NOX4 5 Tage	MD
-	1 +/- 0
TGFβ	1,217 +/- 0,6063
453 nm	0,8311 +/- 0,2333
453 nm + TGFβ	1,199 +/- 0,5990

NOX4 5 Tage MD, normiert auf Kontrolle (-)

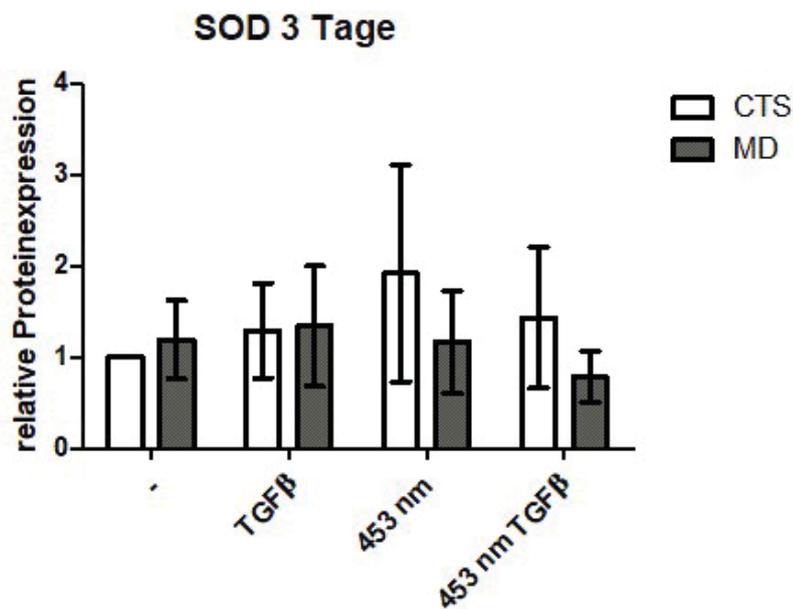


Western Blot Bestrahlungsversuch NOX4 5 Tage CTS, (n = 8)

NOX4 5 Tage	CTS
-	1 +/- 0
TGFβ	2,207053 +/- 2,728287
453 nm	1,245934 +/- 1,250086
453 nm + TGFβ	1,388747 +/- 0,8716684

NOX4 5 Tage CTS, normiert auf Kontrolle (-)

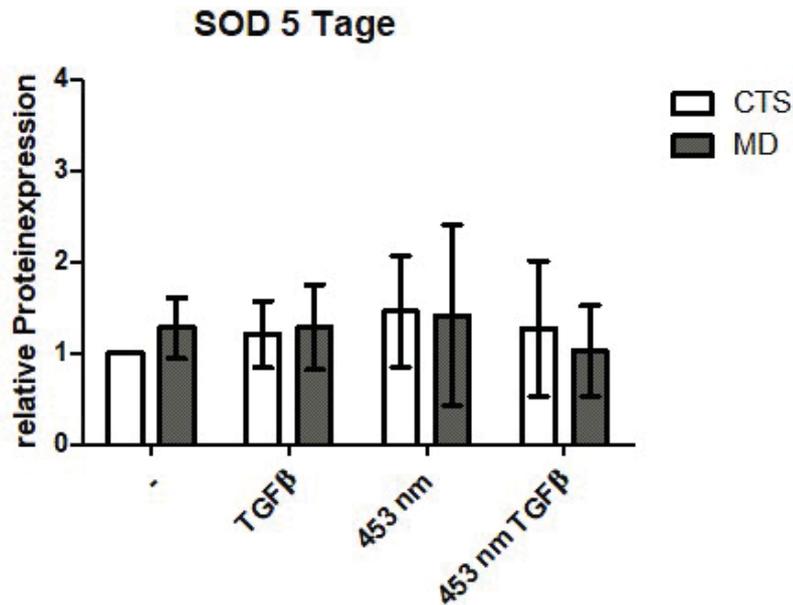
### 6.3.6 IIIf: Beeinflussung der SOD1-Expression durch Bestrahlung



Western Blot Bestrahlungsversuch SOD1 3 Tage CTS vs MD, (n = 8)

SOD1 3 Tage	CTS	MD
-	1 +/- 0	1,194186 +/- 0,514622
TGFβ	1,292827 +/- 0,6203057	1,340392 +/- 0,7859453
453 nm	1,918913 +/- 1,416553	1,168116 +/- 0,6759225
453 nm + TGFβ	1,432816 +/- 0,9269423	0,785809 +/- 0,3348657

SOD1 3 Tage CTS vs MD, normiert auf Kontrolle CTS (-CTS)

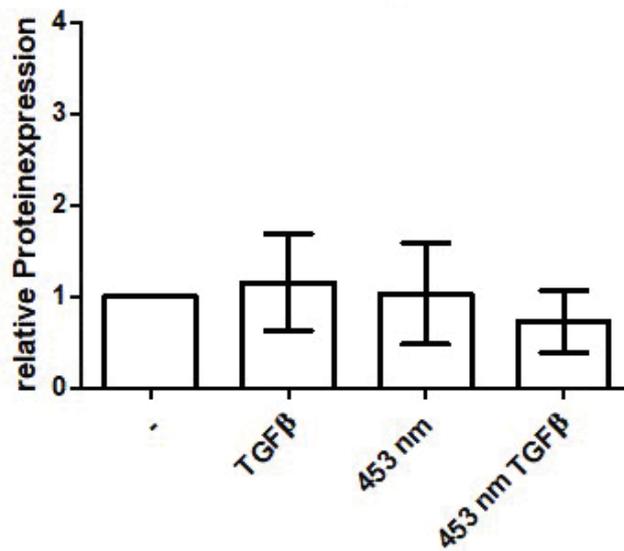


Western Blot Bestrahlungsversuch SOD1 5 Tage CTS vs MD, (n = 8)

SOD1 5 Tage	CTS	MD
-	1 +/- 0	1,277179 +/- 0,3956917
TGFβ	1,208575 +/- 0,4393487	1,284195 +/- 0,5583062
453 nm	1,458325 +/- 0,7314614	1,416269 +/- 1,184671
453 nm + TGFβ	1,270351 +/- 0,8896913	1,025872 +/- 0,597907

SOD1 5 Tage CTS vs MD, normiert auf Kontrolle CTS (-CTS)

### SOD MD 3 Tage



Western Blot Bestrahlungsversuch SOD1 3 Tage MD, (n = 8)

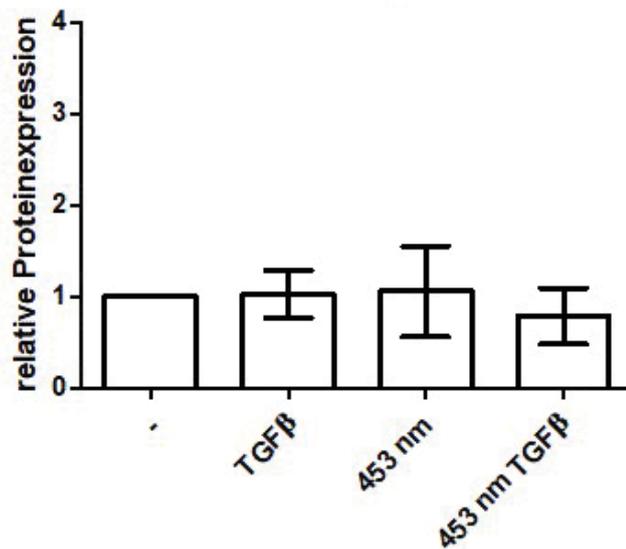
SOD1 3 Tage	MD
-	1 +/- 0
TGFβ	1,153 +/- 0,6363
453 nm	1,035 +/- 0,6651
453 nm + TGFβ	0,7278 +/- 0,4066

SOD1 3 Tage MD, normiert auf Kontrolle (-)

SOD1 3 Tage	CTS
-	1 +/- 0
TGFβ	1,292827 +/- 0,6203057
453 nm	1,918913 +/- 1,416553
453 nm + TGFβ	1,432816 +/- 0,9269423

SOD1 3 Tage CTS, normiert auf Kontrolle (-)

### SOD MD 5 Tage

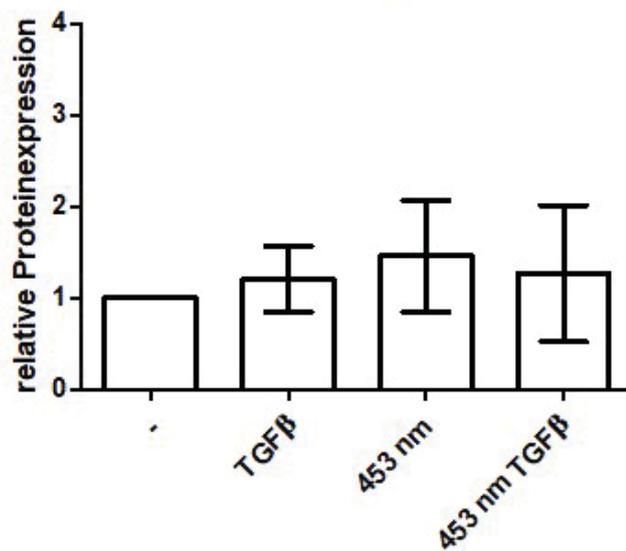


Western Blot Bestrahlungsversuch SOD1 5 Tage MD, (n = 8)

SOD1 5 Tage	MD
-	1 +/- 0
TGFB	1,029 +/- 0,3028
453 nm	1,058 +/- 0,5964
453 nm + TGFB	0,7877 +/- 0,3681

SOD1 5 Tage MD, normiert auf Kontrolle (-)

### SOD CTS 5 Tage



Western Blot Bestrahlungsversuch SOD1 5 Tage CTS, (n = 8)

SOD1 5 Tage	CTS
-	1 +/- 0
TGFβ	1,208575 +/- 0,4393487
453 nm	1,458325 +/- 0,7314614
453 nm + TGFβ	1,270351 +/- 0,8896913

SOD1 5 Tage CTS, normiert auf Kontrolle (-)

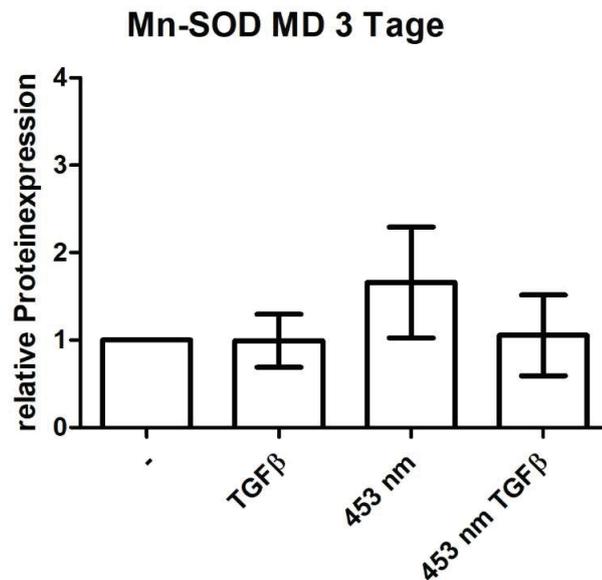
### 6.3.7 IIIg: Beeinflussung der Mn-SOD-Expression durch Bestrahlung

Mn-SOD 3 Tage	CTS	MD
-	1 +/- 0	0,3867115 +/- 0,389554
TGFβ	0,8173712 +/- 0,3424358	0,3820781 +/- 0,340383
453 nm	2,026729 +/- 0,9532995	0,556814 +/- 0,5091751
453 nm + TGFβ	1,122396 +/- 0,7336929	0,3111501 +/- 0,3033996

Mn-SOD 3 Tage CTS vs MD, normiert auf Kontrolle CTS (-CTS)

Mn-SOD 5 Tage	CTS	MD
-	1 +/- 0	0,4550441 +/- 0,3581711
TGFβ	0,4342039 +/- 0,3769146	0,2078478 +/- 0,166525
453 nm	2,048601 +/- 1,387442	0,5402207 +/- 0,5647253
453 nm + TGFβ	0,4311169 +/- 0,2884169	0,1794005 +/- 0,121006

Mn-SOD 5 Tage CTS vs MD, normiert auf Kontrolle CTS (-CTS)



Western Blot Bestrahlungsversuch Mn-SOD 3 Tage MD, (n = 8)

Mn-SOD 3 Tage	MD
-	1 +/- 0
TGFβ	0,9911 +/- 0,3631
453 nm	1,657 +/- 0,7576
453 nm + TGFβ	1,054 +/- 0,5513

Mn-SOD 3 Tage MD, normiert auf Kontrolle (-)

Mn-SOD 3 Tage	CTS
-	1 +/- 0
TGFβ	0,8173712 +/- 0,3424358
453 nm	2,026729 +/- 0,9532995
453 nm + TGFβ	1,122396 +/- 0,7336929

Mn-SOD 3 Tage CTS, normiert auf Kontrolle (-)

Mn-SOD 5 Tage	MD
-	1 +/- 0
TGFβ	0,4642 +/- 0,2188
453 nm	1,115 +/- 0,4510
453 nm + TGFβ	0,4662 +/- 0,2047

Mn-SOD 5 Tage MD, normiert auf Kontrolle (-)

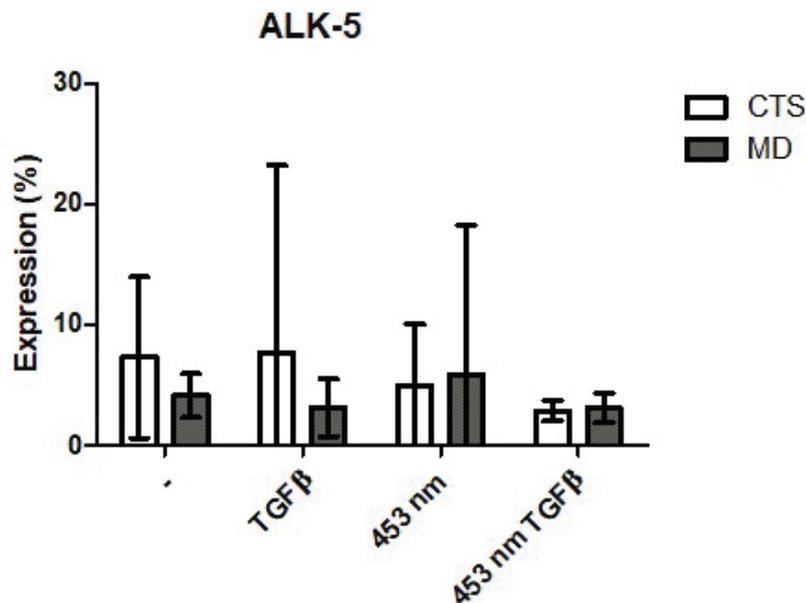
Mn-SOD 5 Tage	CTS
-	1 +/- 0
TGFβ	0,4342039 +/- 0,3769146
453 nm	2,048601 +/- 1,387442
453 nm + TGFβ	0,4311169 +/- 0,2884169

Mn-SOD 5 Tage CTS, normiert auf Kontrolle (-)

### 6.3.8 IIIh: Durchflusszytometrische Analyse

hLAP TGFβ	CTS	MD
-	11,65625 +/- 4,503396	24,8575 +/- 11,93724
TGFβ	18,515 +/- 7,981234	35,245 +/- 9,849829
453 nm	13,21625 +/- 6,45625	28,7475 +/- 8,894091
453 nm + TGFβ	22,6775 +/- 6,882092	42,5275 +/- 10,1252

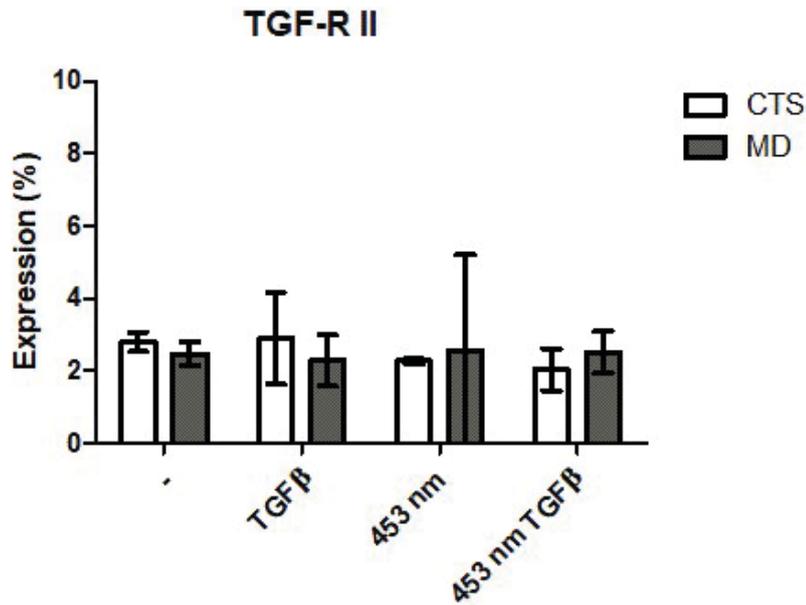
FACS hLAP-TGF CTS vs MD in %



FACS ALK-5 CTS vs MD, MD (n = 3), CTS n = 4

ALK-5	CTS	MD
-	7,2725 +/- 4,195532	4,123333 +/- 0,7343249
TGFβ	7,6875 +/- 9,738238	3,106667 +/- 0,9556325
453 nm	4,930 +/- 3,197822	5,816667 +/- 5,008816
453 nm + TGFβ	2,845 +/- 0,5453134	3,090 +/- 0,5050743

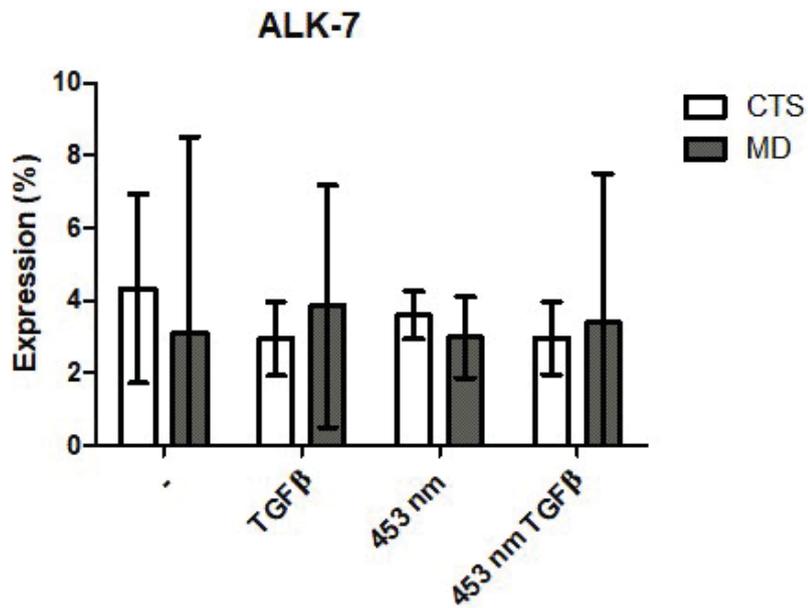
FACS ALK-5 CTS vs MD in %



FACS TGF-R II CTS vs MD, MD (n = 3), CTS n = 4

TGF-R II	CTS	MD
-	2,795 +/- 0,1684241	2,470 +/- 0,130
TGFβ	2,8925 +/- 0,7982638	2,280 +/- 0,2851315
453 nm	2,2675 +/- 0,05499995	2,536667 +/- 1,071883
453 nm + TGFβ	2,040 +/- 0,3627671	2,503333 +/- 0,2318045

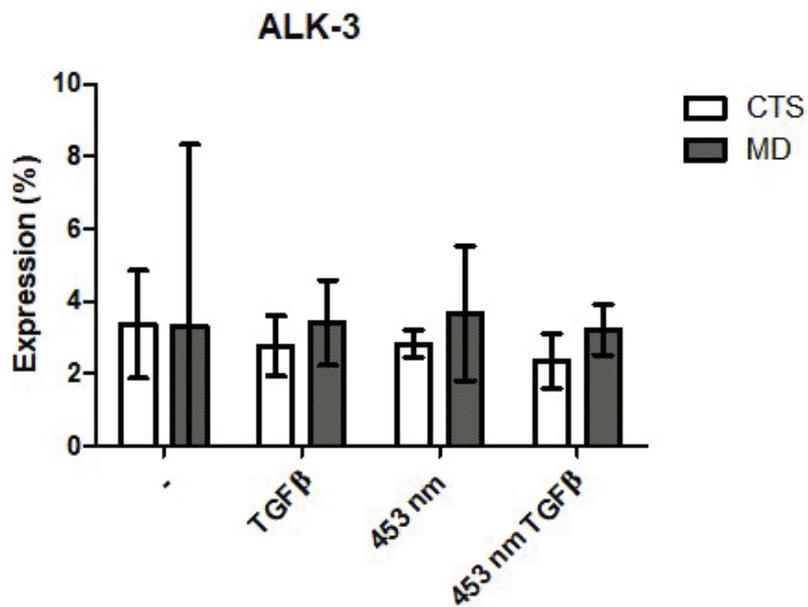
FACS TGF-R II CTS vs MD in %



FACS ALK-7 CTS vs MD, MD (n = 3), CTS n = 4

ALK-7	CTS	MD
-	4,325 +/- 1,634676	3,093333 +/- 2,178861
TGFβ	2,9425 +/- 0,6396027	3,843333 +/- 1,342473
453 nm	3,5875 +/- 0,4157223	2,980 +/- 0,4491103
453 nm + TGFβ	2,965 +/- 0,6289408	3,383333 +/- 1,658141

FACS ALK-7 CTS vs MD in %



FACS ALK-3 CTS vs MD, MD (n = 3), CTS n = 4

ALK-3	CTS	MD
-	3,3675 +/- 0,93318	3,323333 +/- 2,015176
TGFβ	2,760 +/- 0,5196794	3,406667 +/- 0,4759552
453 nm	2,820 +/- 0,2384673	3,673333 +/- 0,7480865
453 nm + TGFβ	2,3475 +/- 0,4798871	3,220 +/- 0,280

FACS ALK-3 CTS vs MD in %

### 6.3.9 IIIi: Behandlung mit SB 431542

α-sma MD	K	SB
-	1,000 +/- 0,000	0,9913374 +/- 0,1591934
TGFβ 1 ng/ml	3,639388 +/- 1,921538	1,407235 +/- 1,068935
TGFβ 5 ng/ml	3,636778 +/- 2,265021	1,851555 +/- 1,659588
TGFβ 10 ng/ml	2,95352 +/- 1,496735	1,190264 +/- 0,5340284

α-sma MD, K vs SB, normiert auf Kontrolle (-K)

α-sma MD	K	SB
-	1,000 +/- 0,000	0,9913374 +/- 0,1591934
TGFβ 1 ng/ml	1,000 +/- 0,000	0,3629445 +/- 0,1103971
TGFβ 5 ng/ml	1,000 +/- 0,000	0,4923635 +/- 0,1884311
TGFβ 10 ng/ml	1,000 +/- 0,000	0,4158062 +/- 0,1064172

α-sma MD, K vs SB, normiert auf jeweilige TGF-Kontrolle (-/ TGF1/ TGF5/ TGF10K)

α-sma CTS	K	SB
-	1,000 +/- 0,000	1,274203 +/- 0,3557853
TGFβ 1 ng/ml	6,928982 +/- 6,737401	1,353056 +/- 0,3113548
TGFβ 5 ng/ml	5,811269 +/- 5,19096	1,594997 +/- 1,417774
TGFβ 10 ng/ml	5,318968 +/- 4,643726	1,116353 +/- 0,547084

α-sma CTS, K vs SB, normiert auf Kontrolle (-K)

α-sma CTS	K	SB
-	1,000 +/- 0,000	1,274204 +/- 0,3557854
TGFβ 1 ng/ml	1,000 +/- 0,000	0,4241013 +/- 0,3110251
TGFβ 5 ng/ml	1,000 +/- 0,000	0,3500128 +/- 0,2087886
TGFβ 10 ng/ml	1,000 +/- 0,000	0,3204301 +/- 0,1915786

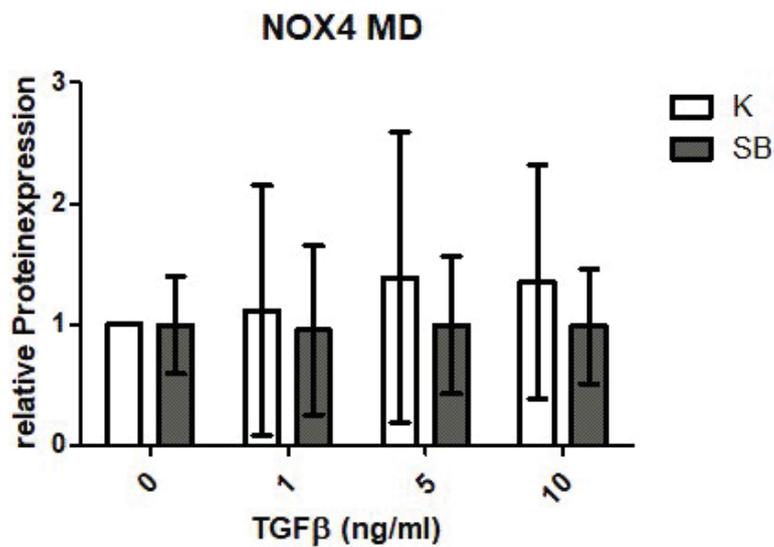
α-sma CTS, K vs SB, normiert auf jeweilige TGF-Kontrolle (-/ TGF1/ TGF5/ TGF10K)

Mn-SOD MD	K	SB
-	1,000 +/- 0,000	3,182736 +/- 1,972395
TGFβ 1 ng/ml	0,4179933 +/- 0,1758611	1,392682 +/- 0,7142307
TGFβ 5 ng/ml	0,5618124 +/- 0,2994507	1,23218 +/- 0,3865613
TGFβ 10 ng/ml	0,5324278 +/- 0,2183442	1,117248 +/- 0,386181

Mn-SOD MD, K vs SB, normiert auf Kontrolle (-K)

Mn-SOD CTS	K	SB
-	1,000 +/- 0,000	3,558228 +/- 1,228982
TGFβ 1 ng/ml	0,7596717 +/- 0,2283664	3,192575 +/- 2,082533
TGFβ 5 ng/ml	0,7782434 +/- 0,2622587	2,469037 +/- 2,042504
TGFβ 10 ng/ml	0,584686 +/- 0,1628054	1,10528 +/- 0,4350276

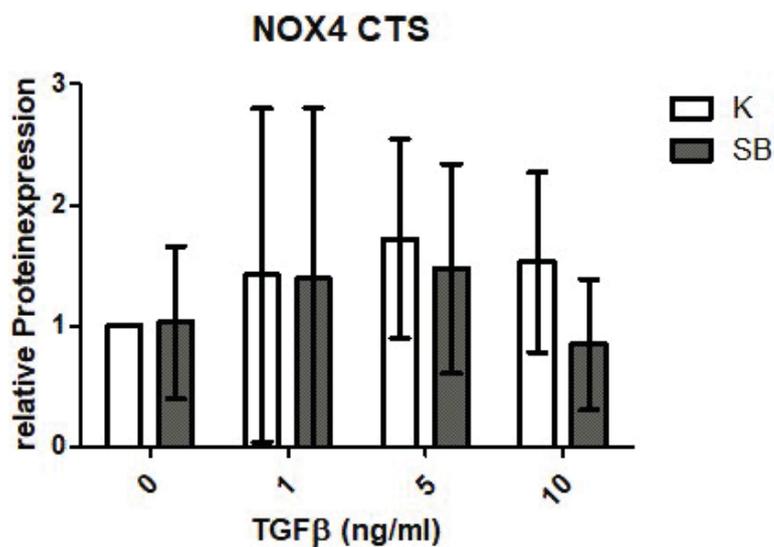
Mn-SOD CTS, K vs SB, normiert auf Kontrolle (-K)



SB-Versuch NOX4 MD, K vs SB, (n = 5)

NOX4 MD	K	SB
-	1,000 +/- 0,000	0,9931619 +/- 0,3244079
TGFβ 1 ng/ml	1,112114 +/- 0,8345711	0,9511443 +/- 0,5628878
TGFβ 5 ng/ml	1,386871 +/- 0,9672102	0,9927325 +/- 0,4609184
TGFβ 10 ng/ml	1,349873 +/- 0,7804486	0,9825966 +/- 0,3843829

NOX4 MD, K vs SB, normiert auf Kontrolle (-K)

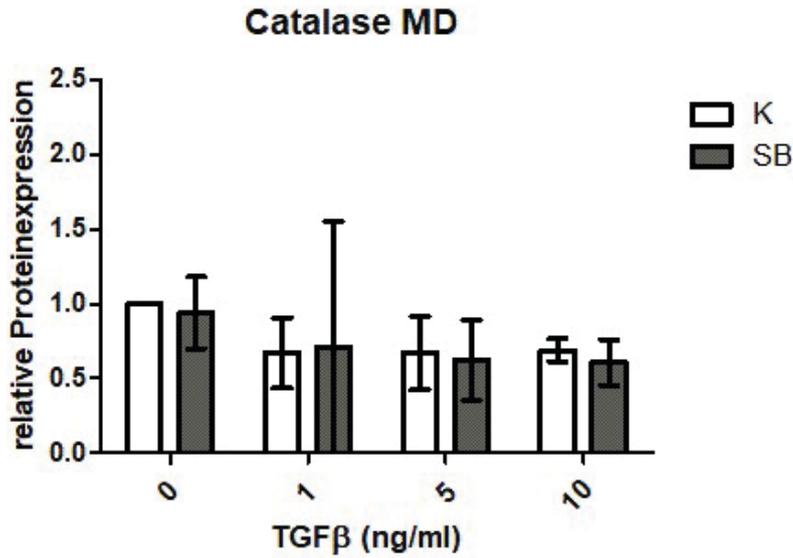


SB-Versuch NOX4 CTS, K vs SB, (n = 5)

NOX4 CTS	K	SB
-	1,000 +/- 0,000	1,026888 +/- 0,5094081
TGFβ 1 ng/ml	1,41793 +/- 1,110548	1,389931 +/- 1,141805

TGFβ 5 ng/ml	1,720759 +/- 0,6648141	1,472319 +/- 0,6998444
TGFβ 10 ng/ml	1,526193 +/- 0,6000156	0,8441841 +/- 0,4360714

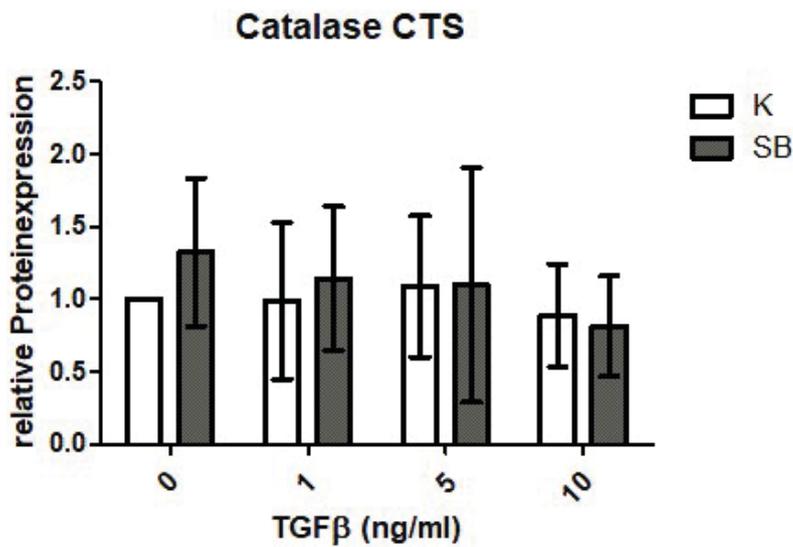
NOX4 CTS, K vs SB, normiert auf Kontrolle (-K)



SB-Versuch Katalase MD, K vs SB, (n = 3)

Katalase MD	K	SB
-	1,000 +/- 0,000	0,9383825 +/- 0,09686822
TGFβ 1 ng/ml	0,6706721 +/- 0,09502155	0,713554 +/- 0,3378806
TGFβ 5 ng/ml	0,6704794 +/- 0,09963023	0,6224954 +/- 0,1092079
TGFβ 10 ng/ml	0,6889375 +/- 0,03013358	0,6083182 +/- 0,06183824

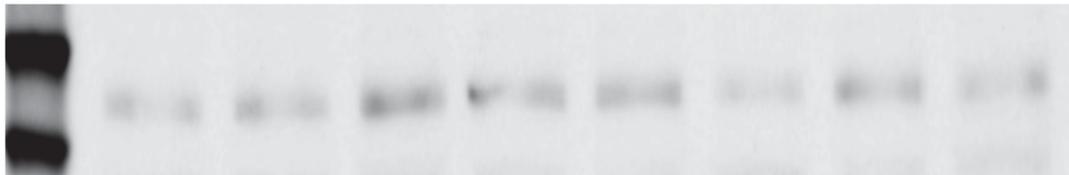
Katalase MD, K vs SB, normiert auf Kontrolle (-K)



SB-Versuch Katalase CTS, K vs SB, (n = 5)

Katalase CTS	K	SB
-	1,000 +/- 0,000	1,324211 +/- 0,4107604
TGFβ 1 ng/ml	0,9894843 +/- 0,4354066	1,142138 +/- 0,4003842
TGFβ 5 ng/ml	1,087507 +/- 0,3926723	1,097649 +/- 0,6532205
TGFβ 10 ng/ml	0,8882151 +/- 0,2863278	0,8133408 +/- 0,2801406

Katalase CTS, K vs SB, normiert auf Kontrolle (-K)



Standard  
 - TGFβ 1 ng/ml TGFβ 5 ng/ml TGFβ 10 ng/ml  
 K SB K SB K SB K SB

NOX4 MD, K vs SB, exemplarischer Western Blot Mit (von links nach rechts) Standard, K-, SB-, K+TGFβ 1 ng/ml, SB+TGFβ 1 ng/ml, K+TGFβ 5 ng/ml, SB+TGFβ 5 ng/ml, K+TGFβ 10 ng/ml, SB+TGFβ 10 ng/ml.



Standard  
 - TGFβ 1 ng/ml TGFβ 5 ng/ml TGFβ 10 ng/ml  
 K SB K SB K SB K SB

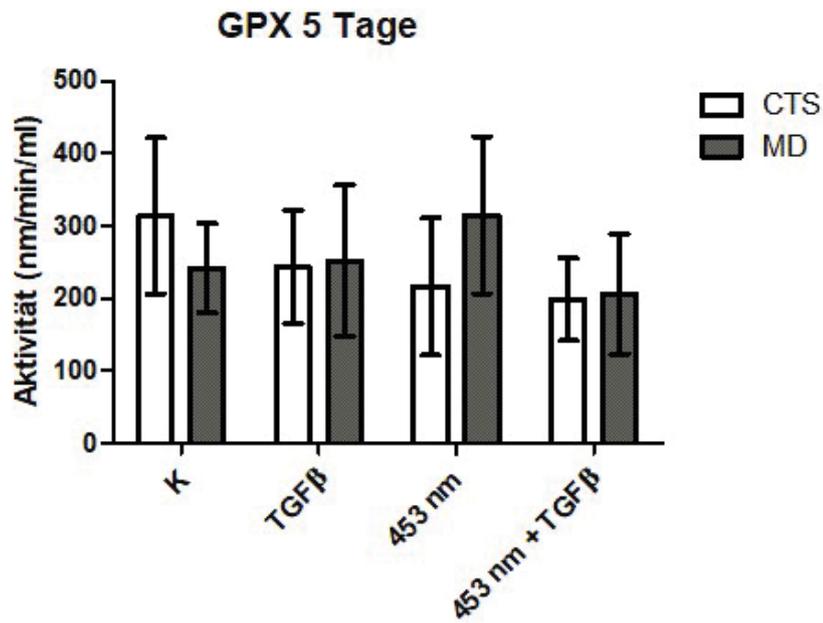
NOX4 CTS, K vs SB, exemplarischer Western Blot Mit (von links nach rechts) Standard, K-, SB-, K+TGFβ 1 ng/ml, SB+TGFβ 1 ng/ml, K+TGFβ 5 ng/ml, SB+TGFβ 5 ng/ml, K+TGFβ 10 ng/ml, SB+TGFβ 10 ng/ml.



Standard  
 - TGFβ 1 ng/ml TGFβ 5 ng/ml TGFβ 10 ng/ml  
 K SB K SB K SB K SB

Katalase MD, K vs SB, exemplarischer Western Blot Mit (von links nach rechts) Standard, K-, SB-, K+TGFβ 1 ng/ml, SB+TGFβ 1 ng/ml, K+TGFβ 5 ng/ml, SB+TGFβ 5 ng/ml, K+TGFβ 10 ng/ml, SB+TGFβ 10 ng/ml.

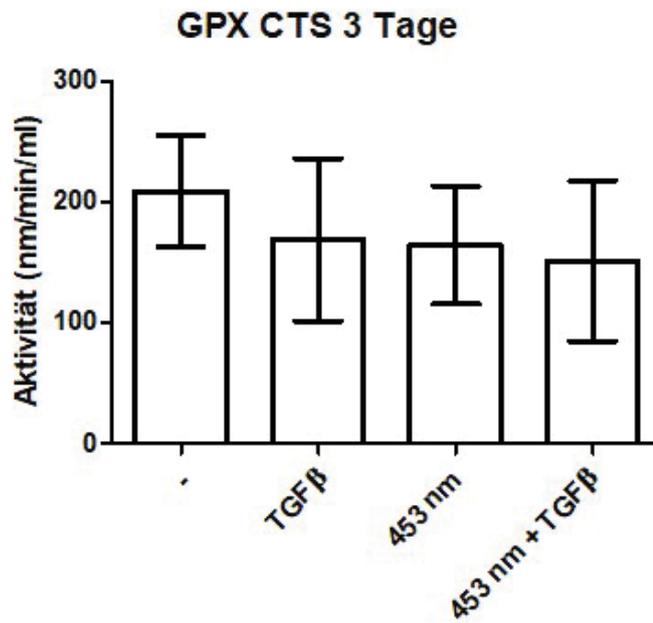




GPX 5 Tage CTS vs MD, n = 9

GPX 5 Tage	CTS	MD
-	313,7345 +/- 139,4099	241,5101 +/- 80,16594
TGFβ	243,2727 +/- 101,778	251,9797 +/- 134,8642
453 nm	216,4353 +/- 122,8489	314,803 +/- 140,6893
453 nm + TGFβ	198,1939 +/- 74,02428	206,3519 +/- 107,4981

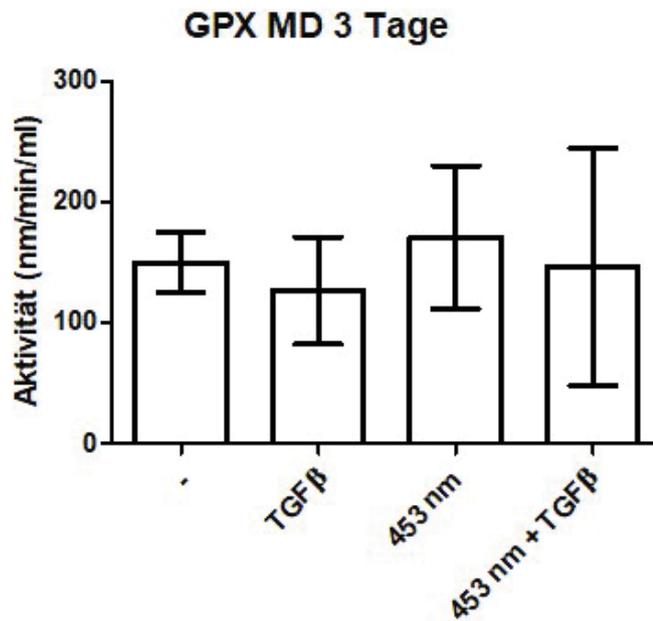
GPX 5 Tage CTS vs MD, Aktivität in nm/min/ml



*GPX 3 Tage CTS, n = 9*

GPX 3 Tage	CTS
-	208,3301 +/- 59,82188
TGFβ	168,5729 +/- 87,45414
453 nm	164,1616 +/- 63,68283
453 nm + TGFβ	150,9188 +/- 86,38426

*GPX 3 Tage CTS, Aktivität in nm/min/ml*



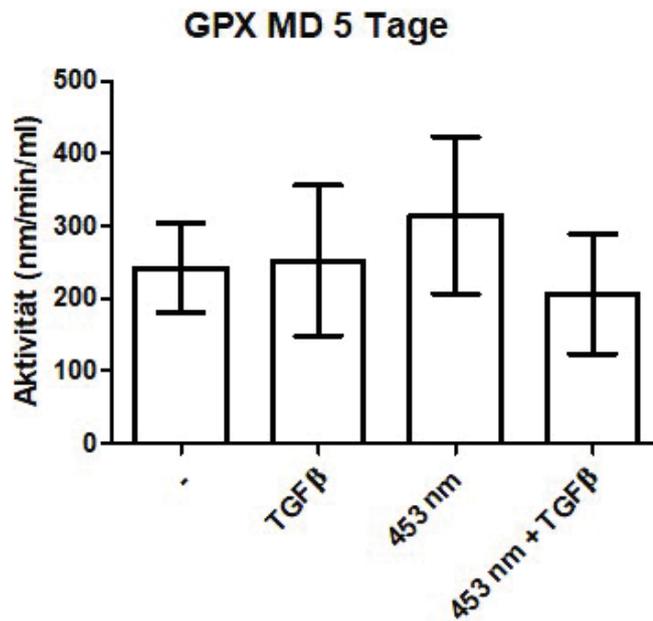
GPX 3 Tage MD, n = 9

GPX 3 Tage	MD
-	149,7189 +/- 32,70509
TGFβ	126,3951 +/- 57,43673
453 nm	170,6352 +/- 76,93801
453 nm + TGFβ	146,1379 +/- 127,7023

GPX 3 Tage MD, Aktivität in nm/min/ml

GPX 5 Tage	CTS
-	313,7345 +/- 139,4099
TGFβ	243,2727 +/- 101,778
453 nm	216,4353 +/- 122,8489
453 nm + TGFβ	198,1939 +/- 74,02428

GPX 5 Tage CTS, Aktivität in nm/min/ml



GPX 5 Tage MD, n = 9

GPX 5 Tage	MD
-	241,5101 +/- 80,16594
TGFβ	251,9797 +/- 134,8642
453 nm	314,803 +/- 140,6893
453 nm + TGFβ	206,3519 +/- 107,4981

GPX 5 Tage MD, Aktivität in nm/min/ml

### 6.3.11 IIIk: Beeinflussung der $\alpha$ -sma-Expression durch $H_2O_2$ Behandlung

$H_2O_2$ -Behandlung	$\alpha$ -sma
-	1 +/- 0
TGFβ 1 ng/ml	5,069 +/- 1,550
TGFβ 1 ng/ml + 10 $H_2O_2$	5,545 +/- 2,088
TGFβ 1 ng/ml + 20 $H_2O_2$	6,486 +/- 1,734
TGFβ 1 ng/ml + 50 $H_2O_2$	3,545 +/- 1,623

$H_2O_2$  MD,  $\alpha$ -sma, TGFβ 1 ng/ml normiert auf Kontrolle (-)

$H_2O_2$ -Behandlung	$\alpha$ -sma
-	1 +/- 0
TGFβ 5 ng/ml	5,668 +/- 1,715
TGFβ 5 ng/ml + 10 $H_2O_2$	5,998 +/- 2,325
TGFβ 5 ng/ml + 20 $H_2O_2$	6,336 +/- 2,926
TGFβ 5 ng/ml + 50 $H_2O_2$	3,463 +/- 1,791

$H_2O_2$  MD,  $\alpha$ -sma, TGFβ 5 ng/ml normiert auf Kontrolle (-)

$H_2O_2$ -Behandlung	$\alpha$ -sma
-	1 +/- 0
TGFβ 10 ng/ml	5,934 +/- 3,000

TGFβ 10 ng/ml + 10 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,775 +/- 1,807
TGFβ 10 ng/ml + 20 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,026 +/- 1,657
TGFβ 10 ng/ml + 50 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,359 +/- 0,8782

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> MD, α-sma, TGFβ 10 ng/ml normiert auf Kontrolle (-)

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Behandlung	α-sma
TGFβ 10 ng/ml	1 +/- 0
TGFβ 10 ng/ml + 10 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,6521 +/- 0,07532
TGFβ 10 ng/ml + 20 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,4948 +/- 0,08852
TGFβ 10 ng/ml + 50 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,2491 +/- 0,1364

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> MD, α-sma, TGFβ 10 ng/ml normiert auf TGF (TGFβ 10 ng/ml)

## 6.4 Anhang IV: Rohwerte

TGF hLAP CTS, %								
-	14,89	7,05	8,3	17,67	7,35	7,46	15,84	14,69
TGFβ	21,62	16,01	22,77	13,3	10,98	14,35	35,45	13,64
453 nm	13,27	13,75	9,68	12,58	6,62	11,59	10,1	28,14
453 nm + TGFβ	28,5	22,55	20,7	18,89	9,96	22,98	33,37	24,47

TGF hLAP MD, %								
-	34,86	38,46	7,44	40,84	17,92	16,03	19,78	23,53
TGFβ	24,51	29,68	25,92	44,97	26,49	37,46	43,46	49,47
453 nm	29,9	16,79	31,46	30,32	18,05	26,77	31,38	45,31
453 nm + TGFβ	28,03	37,71	47,72	56,88	36,9	35,08	42,56	55,34

ALK3 CTS, %								
-			3,87	2,17		3,13		4,3
TGFβ			2,25	3,46		2,81		2,52
453 nm			3	2,88		2,47		2,93
453 nm + TGFβ			2,64	2,57		1,63		2,55

ALK3 MD, %								
-				5,25	3,49			1,23
TGFβ				3,32	3,92			2,98
453 nm				4,08	4,13			2,81
453 nm + TGFβ				3,1	3,54			3,02

ALK7 CTS, %								
-			4,73	1,91		5,34		5,32
TGFβ			2,48	3,87		2,86		2,56
453 nm			3,38	3,13		3,77		4,07
453 nm + TGFβ			3,3	2,14		2,84		3,58

ALK7 MD, %								
-				5,4	2,81			1,07
TGFβ				3,16	5,39			2,98
453 nm				3,46	2,91			2,57
453 nm + TGFβ				2,05	5,24			2,86

TGF-RII CTS, %				
-	2,93	2,55	2,83	2,87
TGFβ	2,83	4	2,63	2,11
453 nm	2,34	2,28	2,23	2,22
453 nm + TGFβ	1,85	2,57	1,77	1,97

TGF-RII MD, %				
-	2,54	2,55	2,32	
TGFβ	1,99	2,56	2,29	
453 nm	3,77	1,83	2,01	
453 nm + TGFβ	2,39	2,35	2,77	

ALK5 CTS, %				
-	6,59	13,26	5,72	3,52
TGFβ	1,88	22,26	3,27	3,34
453 nm	3,37	9,72	3,11	3,52
453 nm + TGFβ	2,8	3,24	2,09	3,25

ALK5 MD, %				
-	3,74	4,97	3,66	
TGFβ	2,57	4,21	2,54	
453 nm	11,60	2,87	2,98	
453 nm + TGFβ	2,59	3,60	3,08	

GPX 3 Tage MD (nm/min/ml)									
-	186,15	171,82	118,67	104,63	177,84	138,05	191,25	141,24	117,78
-	7	6	8	6	8	0	4	1	0
		142,47			154,25	119,33	131,48	258,12	
TGFβ	87,513	0	66,226	86,826	8	1	3	7	91,322
	185,32	271,16	107,27	321,05	154,21	150,40	134,89	105,37	106,01
453 nm	2	5	0	8	3	7	9	2	1
453 nm +	400,92	135,51			133,67	142,42		305,19	
TGFβ	6	3	45,913	64,834	5	7	10,264	0	76,500

GPX 5 Tage MD (nm/min/ml)									
-	181,00	286,47	144,83	186,82	416,64	284,13	230,00	221,35	222,32
-	9	0	5	7	2	0	1	7	2
	225,67	486,61	102,12	187,25	263,69	171,85	172,87	467,57	190,17
TGFβ	0	2	2	1	7	2	2	0	2
	184,62	365,91	319,47	111,33	229,73	489,78	448,00	484,08	200,27
453 nm	6	3	1	7	9	5	0	4	2
453 nm +	170,57	308,59		122,01	383,38	222,08	149,43	317,86	
TGFβ	4	1	93,496	7	5	8	6	1	89,720

GPX 3 Tage CTS (nm/min/ml)									
-	212,17	216,20	195,75	333,63	206,74	256,83	136,86	147,42	169,31
-	4	9	7	5	8	5	8	8	8
	122,43		134,81	264,48	247,79		314,18	102,82	174,23
TGFβ	5	61,635	7	7	1	94,748	2	6	5
	165,84		148,59	272,83	268,38	109,49	147,66	137,46	128,39
453 nm	3	98,783	1	5	3	6	4	3	7
453 nm +			146,36	332,80	248,90	138,01	114,72	138,51	
TGFβ	86,817	71,096	5	0	4	7	6	2	81,031

GPX 5 Tage CTS (nm/min/ml)									
-	232,90	212,73	247,23	377,87	416,55	630,47	254,89	213,96	236,96
	4	0	5	8	7	9	7	4	6
TGFβ	209,11	154,01	201,32	381,63	386,22	204,66	348,56	112,31	191,60
	3	7	2	5	6	1	2	0	8
453 nm	228,31	121,87	229,84	406,12	414,05		186,13		193,00
	3	8	3	2	2	89,043	2	79,528	6
453 nm +	247,37	152,90	200,20	313,73	294,12	113,39	161,98	107,20	192,81
TGFβ	4	4	9	9	2	1	6	7	3

SBV α-sma MD					
0 ng/ml TGFβ	886520	15857780	3357018	3746160	2973708
1 ng/ml TGFβ	5879307	70804500	8974153	7328252	7346904
5 ng/ml TGFβ	5281010	98384580	5082179	7209507	7684931
10 ng/ml TGFβ	3809776	76469720	5216416	7018442	6603249
0 ng/ml TGFβ + SB	1101085	14203060	2835604	3463760	3121526
1 ng/ml TGFβ + SB	2817562	24720900	1757517	2529153	3272165
5 ng/ml TGFβ + SB	4181302	29801080	2602622	3529331	2808884
10 ng/ml TGFβ + SB	1631526	23911950	1701976	3047978	3813582

SBV α-sma CTS					
0 ng/ml TGFβ	5626164	1737744	3363360	3482160	3779364
1 ng/ml TGFβ	5541180	4579676	40467940	9893567	61041980
5 ng/ml TGFβ	8078398	4309237	42214910	8067891	38823000
10 ng/ml TGFβ	6887905	3604602	33027890	8964204	41202790
0 ng/ml TGFβ + SB	5826733	1946012	5807601	5485582	3452273
1 ng/ml TGFβ + SB	4528403	2708361	5058035	4891954	5643058
5 ng/ml TGFβ + SB	4757201	605315	5468378	4055810	15081540
10 ng/ml TGFβ + SB	2260629	2093812	3277566	3738978	7282130

SBV MnSOD MD					
0 ng/ml TGFβ	5985576	46431460	3541482	13093190	5775975
1 ng/ml TGFβ	3901731	11050280	1947875	3851391	2055963
5 ng/ml TGFβ	4217909	28449590	3263231	1596988	2589134
10 ng/ml TGFβ	3168953	31424570	2851700	3349937	2280537
0 ng/ml TGFβ + SB	29418180	132894400	3924237	72092020	8794046
1 ng/ml TGFβ + SB	2934780	65257050	3165176	26265420	12521570
5 ng/ml TGFβ + SB	8787344	46785150	3411935	23572480	5322062
10 ng/ml TGFβ + SB	6635579	26833750	3311953	20123080	8245906

SBV MnSOD CTS					
0 ng/ml TGFβ	89281230	3777453	6898980	16972080	12404250
1 ng/ml TGFβ	34605070	3001611	5047845	15526620	12027620
5 ng/ml TGFβ	42274660	4463612	4970681	14347850	8313286
10 ng/ml TGFβ	34887860	2528766	4097410	13615340	5793958
0 ng/ml TGFβ + SB	172718700	12900100	36256400	69487040	38354480
1 ng/ml TGFβ + SB	45095420	13880410	43156060	51469140	30951590
5 ng/ml TGFβ + SB	49820060	2950505	35581670	30490930	50262360
10 ng/ml TGFβ + SB	38137910	3796694	10859810	19712250	16852050

SBV NOX MD					
0 ng/ml TGFβ	3723304	1447978	2220498	2044124	3426498
1 ng/ml TGFβ	2015068	1155694	1681127	5291120	3000501
5 ng/ml TGFβ	2010781	4119237	1131530	3550622	4464411
10 ng/ml TGFβ	1665961	3471438	2714104	3771767	2868029
0 ng/ml TGFβ + SB	4060823	1722989	1191304	2757833	2739748
1 ng/ml TGFβ + SB	1284954	1900770	742987	3021259	4404006
5 ng/ml TGFβ + SB	4509374	2240131	2257869	1822525	1017819
10 ng/ml TGFβ + SB	2013577	2002771	1735785	2844407	2795389

SBV NOX CTS					
0 ng/ml TGFβ	7787988	4005372	2624688	5051880	2008968
1 ng/ml TGFβ	4275834	6480854	3569585	16026980	783693
5 ng/ml TGFβ	8220587	7302099	3692019	14166110	3042372
10 ng/ml TGFβ	7900110	5730306	3017691	12828350	3007138
0 ng/ml TGFβ + SB	10183160	4451152	3443346	6446746	256314
1 ng/ml TGFβ + SB	7650662	6263000	2059470	16548990	689432
5 ng/ml TGFβ + SB	10578650	2737828	2480337	10504700	4611301
10 ng/ml TGFβ + SB	8217248	1745183	822554	6276280	2359202

SBV Katalase MD					
0 ng/ml TGFβ		57420340	70405620		59904500
1 ng/ml TGFβ		43409430	48421780		34041820
5 ng/ml TGFβ		39265140	39768700		45693220
10 ng/ml TGFβ		38977620	46831760		43300760
0 ng/ml TGFβ + SB		60019270	60293640		54723400
1 ng/ml TGFβ + SB		36266520	29865420		64988840
5 ng/ml TGFβ + SB		42923020	38424040		34397820
10 ng/ml TGFβ + SB		30959760	46350590		37586510

SBV Katalase CTS					
0 ng/ml TGFβ	81382970	25253620	35311190	45919320	62646860
1 ng/ml TGFβ	40591860	20680120	55234030	34666860	82104300
5 ng/ml TGFβ	51204410	20956630	58694910	53383640	72278290
10 ng/ml TGFβ	48894380	16808810	46850940	43376200	56586580
0 ng/ml TGFβ + SB	90546710	46530190	53383120	64128870	47460720
1 ng/ml TGFβ + SB	39585120	39657270	40891300	59652340	74977580
5 ng/ml TGFβ + SB	50885560	13727280	36971780	50107200	136644000
10 ng/ml TGFβ + SB	37372150	29679250	27218490	30522560	62441750

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 ng/ml TGFβ					
-		10752190	16144490		6444670
TGFb		55929650	55808220		42201300
TGFb + 10 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		53391470	61484020		50663440
TGFb + 20 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		77563100	72768340		49868710
TGFb + 50 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		54689060	29890070		23819260

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5 ng/ml TGFβ					
--	--	--	--	--	--

-	10752190	16144490	6444670
TGFb	64833380	61372040	46235730
TGFb + 10 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	67272970	57384160	52741200
TGFb + 20 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	74982020	50754300	57290540
TGFb + 50 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	46023140	22744000	30289110

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 ng/ml TGFβ			
-	10752190	16144490	6444670
TGFb	65233580	46314520	57130440
TGFb + 10 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	37998540	33906290	36668970
TGFb + 20 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	38151880	18891630	28087890
TGFb + 50 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25329580	11267930	6603707

α-sma CTS 3 Tage								
-	4396505	1184706	1918787	26251670	1234280	5861608	5274780	7674233
TGFβ	76905140	22990850	9807921	58097000	6102296	10335640	8933803	24023990
453 nm	5542686	1238817	1677942	18917550	1279977	4714947	6218546	12724690
453 nm +								
TGFβ	42555220	9138874	5041214	24645340	3904599	7019090	6658638	21542860

α-sma MD 3 Tage									
-	3687535	5169082	7029155	0	2022665	229430	5045747	7245207	1294482
TGFβ	1365759	3617184	4154461	0	4348570	623822	1015932	2496706	2839694
453 nm	0	0	0	0	0	8	0	0	0
453 nm +									
TGFβ	0	0	1074243	0	1544225	122181	1078861	1980251	0
453 nm	9103655	2271062	0	0	0	0	6576686	0	0
453 nm +	1535148		1232182	1420522	264197		1478818	1618324	
TGFβ	0	7310942	0	0	1	6310363	0	0	

α-sma CTS 5 Tage								
-	9123734	7938128	2728092	224228	5803712	3362582	1436600	1861449
TGFβ	21665900	54295740	36834730	7005896	40624060	16488650	3253998	5210105
453 nm	11827580	14963590	6381165	435587	8443667	3208380	885771	1730747
453 nm + TGFβ	14310600	70606430	26239010	1316702	24613180	6526926	1648783	1556161

α-sma MD 5 Tage								
-	16722120	24452080	7263200	248551	10116270	3983280	2080294	1915700
TGFβ	36164290	48043720	17299080	2361048	78751070	17500760	16861320	5589209
453 nm	16668350	42782010	5348473	187057	9581594	3447585	1751357	1955256
453 nm + TGFβ	25972790	52236100	16839020	711429	37201560	12767390	6290954	1959994

β-Catenin CTS 3 Tage								
-	11123050	6551574	24762330	19639830	13385680	1972606	3060640	7567911
TGFβ	50706390	41507020	49240920	28860830	21884170	2358090	1228324	15439060
453 nm	23196160	16304660	13224840	9518890	8980953	1970894	921131	8956162
453 nm + TGFβ	39893410	44009600	30245160	25428900	21869490	3452234	2685564	20838110

β-Catenin MD 3 Tage								
-	13583510	18663360	9674201	11365910	17962980	2390192	2282879	10499270

TGFβ	30504240	36388810	31572490	16449710	20738970	2398728	1748886	27318830
453 nm	27091830	20107270	22993990	9207024	10211200	3172358	1773209	6996009
453 nm + TGFβ	32167620	9821325	13975840	12624370	9143775	3015452	2944028	31226760

β-Catenin CTS 5 Tage								
-	4721447	7614155	4038052	3916752	6954330	2756641	762406	17269450
TGFβ	16894680	14282790	9982553	13460670	9889324	4577680	1660445	46184200
453 nm	7701749	19782730	6899173	7999575	7105863	2018842	688998	22229120
453 nm + TGFβ	6645026	24211060	41371520	9124665	12216990	3862291	1667272	32623910

β-Catenin MD 5 Tage								
-	7475780	9036847	9171694	6677368	7919735	3531188	721033	33011300
TGFβ	15517040	28469140	11413070	18413920	9949223	4424120	1751600	48930610
453 nm	9080426	25896850	14819130	8420911	8233845	2732007	683879	28959600
453 nm + TGFβ	13375080	27608750	15019940	5991696	15794250	3838160	1316198	52515860

NFκB CTS 3 Tage								
-	8066381	5702774	4257684	2672991	4399408	6631473	3665480	7541820
TGFβ	10345480	3851605	4323802	2438451	4802587	6925829	3548719	8346390
453 nm	10382420	7118767	7239463	4685930	5884633	3423682	3988214	9712908
453 nm + TGFβ	6622371	4288410	5294962	2332350	4570240	5781487	3879456	5823516

NFκB MD 3 Tage								
-	9289761	4604304	2242659	2132701	3040089	7586821	4190997	6849587
TGFβ	11717030	4539905	1570011	2327025	4856957	4967899	4181888	9050208
453 nm	4622933	7299889	5612401	4159769	5264383	4572956	4552723	6930899
453 nm + TGFβ	4192824	3496404	5960603	5772113	3816989	9877305	4533515	4768374

NFκB CTS 5 Tage								
-	3393936	3622938	3227070	6262776	7952464	9235624	7187957	8195768
TGFβ	4789003	5071309	8138037	3681897	8767108	16919930	7889069	8788603
453 nm	7714141	6943524	11514140	10854980	9837933	11683100	9149019	5553410
453 nm + TGFβ	12911010	4833741	12675370	7191437	7168390	17738860	7595654	5734739

NFκB MD 5 Tage								
-	6777552	491059	4975849	3747291	0	1394821	1061314	6592374
	1192799	2	1079327			0	1360445	7706496
TGFβ	0	494756	0	9599293	6604640	0	9388064	7901521
	1378724	1	1479417	1201738		1952171	1070454	
453 nm	0	598743	0	0	7332159	0	0	5043262
453 nm +	1748549	3	741676			1376151		1006115
TGFβ	0	6	7439846	9565429	4762203	0	6654309	0

SOD CTS 3 Tage								
-	7447020	1527614	7067963	1025027	8130822	1033330	1175666	323804
	1959562	0	1216854	1156256		0	0	0
TGFβ	0	1800275	0	0	9318134	6794424	1024047	327037
	3659504	0	2299822	1396271	1032941		0	2
453 nm	0	1813785	0	0	0	8315910	1603559	387512
	0	0	0	0	0		0	6

453 nm +	2639880	1225230	1385451	1043763			1334089	375386
TGFβ	0	0	0	0	8732849	8013035	0	8

SOD MD 3 Tage								
-	6321157	15949080	17026560	10668700	9583847	7677185	13767130	3611689
TGFβ	16511940	17450280	19812970	9289365	7679016	6448792	7387500	4742850
453 nm	16777080	10755210	15952030	7977124	8017848	7937574	9786643	2489808
453 nm + TGFβ	9944177	5071029	6133835	7161043	8343630	5441588	5820399	3246291

SOD CTS 5 Tage								
-	27933410	7601765	12947370	12912980	11002560	10051580	16817130	7510685
TGFβ	47764190	10641630	24256420	14144720	7436845	6620641	20100630	7962014
453 nm	48749300	11246730	40425870	12668600	10353990	13680520	17572250	7447086
453 nm + TGFβ	63372600	8173503	37280660	3370079	9730376	7094554	10747230	10884910

SOD MD 5 Tage								
-		1318863	2287928	1087983	1468088		1788134	859046
	44510500	0	0	0	0	7418304	0	4
			3207632	1399586			1898609	968800
TGFβ	46864810	7621042	0	0	8422291	8520065	0	7
			5496855		1202585	1001339	1100164	815540
453 nm	45157820	7892001	0	7755213	0	0	0	1
453 nm + TGFβ	55783580	6446954	0	4404011	0	7779244	4826711	7

NOX4 CTS 3 Tage								
-	8729769	7541226	6378912	4742364	12702900	13955250	2490904	4167896
TGFβ	20932730	15033700	28995700	20030430	16567800	34640360	4151615	5234607
453 nm	16150270	9487924	26122020	16677570	8232951	12041070	873046	4248708
453 nm + TGFβ	17814600	12959540	11429270	13777010	9131907	16028640	4615902	6663987

NOX4 MD 3 Tage								
-	7203184	6359060	1357111	5029048	8661515	15010390	2631596	1925415
TGFβ	21397340	15256280	1915399	9119961	23595040	12978140	5610362	4138228
453 nm	10756680	11243100	3113597	6420833	5645022	17357540	2530830	1459731
453 nm + TGFβ	7407736	7635460	7050918	6656013	21881100	3631760	5952011	5992554

NOX4 CTS 5 Tage								
-	674769	5251980	1826265	6223672	3868896	7116906	4755884	3398402
TGFβ	548844	8973155	16228420	7419530	4544764	8525890	9180049	2560098
453 nm	218481	7011483	7701335	4947823	4601953	7035936	2005494	2368343
453 nm + TGFβ	507428	6025675	6327795	4894394	4711097	9632318	6603062	3397836

NOX4 MD 5 Tage								
-	954795	7594243	4019773	5730176	6017426	6460479	10159200	1751708
TGFβ	488364	11980740	8829609	5722923	3611049	10611410	6977782	2672208
453 nm	583069	5051844	4914415	6169822	4203264	4762242	6495990	1749366
453 nm + TGFβ	782992	9883853	5566654	4990837	4549799	11151110	4557132	4002022

Mn-SOD CTS 3 Tage								
-------------------	--	--	--	--	--	--	--	--

-	16937520	11451620	8	475120	50158790	42361170	50319630	9200656	55772990
TGFβ	19655220	4080437	8	699342	35638710	30114530	38473180	6284589	37993560
453 nm	51188130	10703310	3	577195	102953100	95543540	50711800	32940220	119698400
453 nm + TGFβ	24842200	2116737	2	512103	47890930	58730480	23569380	23869580	47175860

Mn-SOD MD 3 Tage									
-	5839432	768262	1675843	16379420	27595920	60996950	821792	2767357	
TGFβ	5449791	317739	1701699	24503190	38646500	41082990	675676	3249249	
453 nm	8767150	1833137	1288356	33533540	40038740	79821460	2429258	2320829	
453 nm + TGFβ	4185955	1454901	575787	21164670	41219240	21693670	1075623	2833468	

Mn-SOD CTS 5 Tage									
-	1	43226780	12127610	31269130	47530980	50491760	30499160	41618580	484526
TGFβ	782810	27006050	15625730	6320828	18462120	16370180	9763277	6824463	601416
453 nm	0	81189850	61943040	76619750	54735490	127421700	38555310	32132150	
453 nm + TGFβ	7	18656240	13313570	7481383	17883060	25911920	9662514	8287931	133202

Mn-SOD MD 5 Tage									
-	927051	23100330	11206200	5471111	35548150	44272930	3745214	2834377	
TGFβ	152722	16608960	4382550	4589398	11222070	21400010	1672127	1004516	
453 nm	1242960	11502560	18529240	8364190	24247890	66727180	3815885	1955254	
453 nm + TGFβ	636489	6748296	4207370	4691786	11237410	17267310	1170499	1413903	

Cat CTS 3 Tage									
-	7086335	15715530	12584230	6999366	2953068	2573250	1789704	63299360	
TGFβ	10455130	10640410	6109553	2685480	1389947	807721	2265677	51125830	
453 nm	8694079	11256150	3031440	1837629	1606495	3276427	1792889	41379430	
453 nm + TGFβ	3755505	9124692	2995979	1019263	506171	1557261	627476	47417020	

Cat MD 3 Tage									
-	6984774	10131680	7485067	2815197	3337571	1657208	2048367	57638920	
TGFβ	6269004	6104070	3757250	978680	1581469	1115000	2718908	35755200	
453 nm	8073107	6504411	9618839	1286083	2311037	1736837	2456043	38048600	
453 nm + TGFβ	2597316	1059639	4375743	354232	1050319	788929	651940	22228550	

Cat CTS 5 Tage									
-	8005866	8080910	6049110	1304536	22312380	20871740	2789490	35233740	
TGFβ	8786043	7998523	3669807	1284694	10910800	5589772	1832719	33155510	
453 nm	11561720	14085710	2502894	1452364	20448060	10590590	1208948	24209920	
453 nm + TGFβ	9771652	14652920	4674404	244639	7177669	4537174	1595666	14408300	

Cat MD 5 Tage									
-	9395946	8505847	11052830	1019392	40534910	14661890	5341621	44650780	
TGFβ	12103110	5832641	1603384	1111945	17588610	5125297	2773781	26208810	
453 nm	11173380	15611600	4003065	644930	30485210	7535447	2138091	25152350	

453 nm + TGF $\beta$	9346145	4695896	4266733	391500	15158340	4579680	1492563	16192500
----------------------	---------	---------	---------	--------	----------	---------	---------	----------

Ich möchte mich bei Dr. med. Simon Thelen und Dr. rer. nat. Vera Grotheer für die fachliche Unterstützung, Betreuung der Arbeit und kompetente Hilfe bei Rückfragen bedanken. Bei Jutta Schneider, Samira Seghrouchni und Christa Wilkens möchte ich mich für die praktische Einarbeitung sowie Unterstützung und mannigfaltige Hilfe erkenntlich zeigen. Weiterhin möchte ich das Team der Unfall- und Handchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf unter Prof. Dr. med. Joachim Windolf erwähnen, die eine freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre geschaffen haben. Vielen Dank auch an Dr. med. Timm J. Filler für die Co-Betreuung der Arbeit. Zu Guter Letzt möchte ich mich auch bei meiner Familie und Freunden bedanken, die mir während der letzten Jahre immerzu mit Rat und Tat zur Seite standen. All diese Menschen haben mich unterstützt und damit einen Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit geleistet. Vielen Dank.